



Caracterización de subproductos de la industria vitivinícola y su aplicabilidad en cosmética

La industria vitivinícola genera anualmente millones de toneladas de residuos o subproductos. Estos residuos o subproductos han de ser gestionados para minimizar el impacto medioambiental que pueden provocar. Buscar estrategias que permitan su utilización y puesta en valor repercutiría de forma positiva en el sector, mejorando el rendimiento económico de las explotaciones vitivinícolas, a la par que se disminuiría el impacto medioambiental al convertir estos residuos en nuevos recursos materiales.

En la presente tesis doctoral se ha realizado un estudio de algunos subproductos, de especial interés, de la industria enológica andaluza. Se ha realizado una caracterización en compuestos bioactivos de interés industrial. Posteriormente y en base a los resultados obtenidos, se ha considerado y valorado su posible aplicabilidad en la industria cosmética.



Caracterización de subproductos de la industria vitivinícola y su aplicabilidad en cosmética



Yolanda Carmona Jiménez
Tesis doctoral, 2015

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CÁDIZ



***CARACTERIZACIÓN DE SUBPRODUCTOS DE LA
INDUSTRIA VITIVINÍCOLA Y SU APLICABILIDAD EN
COSMÉTICA.***

YOLANDA CARMONA JIMÉNEZ

TESIS DOCTORAL, 2015

Dominico A. Guillén Sánchez, Catedrático de Universidad y director del departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

HACE CONSTAR:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Caracterización de subproductos de la industria vitivinícola y su aplicabilidad en cosmética” constituye la Memoria que presenta D^a. Yolanda Carmona Jiménez para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Cádiz, habiéndose realizado la investigación en el Departamento de Química Analítica de esta Universidad bajo la dirección de los profesores doctores D. Carmelo García Barroso y D^a. M^a de Valme García Moreno.

Y para que conste y surtan los efectos oportunos, firmo el presente en Puerto Real a veinticuatro de noviembre de dos mil quince.

Fdo: Dr. D. Dominico A. Guillén Sánchez

Carmelo García Barroso, Catedrático de Universidad, y M^a de Valme García Moreno, Profesora Titular de Universidad, ambos del departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

INFORMAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “Caracterización de subproductos de la industria vitivinícola y su aplicabilidad en cosmética” constituye la Memoria que presenta D^a. Yolanda Carmona Jiménez para aspirar al grado de Doctor por la Universidad de Cádiz, ha sido realizado en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz y en los del Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas (CAIV), bajo nuestra dirección. Ha sido supervisada por nosotros y consideramos que cumple los requisitos legales para optar al grado de Doctor en Química.

Y para que conste y surtan los efectos oportunos, expedimos y firmamos el presente informe en Puerto Real a veinticuatro de noviembre de dos mil quince.

Fdo: Dr. D. Carmelo García Barroso

Dr. D^a. M^a de Valme García Moreno



Universidad
de Cádiz

Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias

Facultad de Ciencias
Campus Universitario de Puerto Real
11510 Puerto Real, Cádiz.
Tel.: 956016364. Fax: 956016460
dept.quimica-analitica@uca.es

La presente tesis doctoral ha sido realizada gracias a la financiación del proyecto de excelencia *AGR-6874* por parte de la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa de la Junta de Andalucía. La autora de esta tesis ha disfrutado de una beca predoctoral asociada a dicho proyecto.

AGRADECIMIENTOS.

Son muchas las personas que de una u otra forma han contribuido en la realización y consecución de este trabajo.

Quisiera agradecer a mis directores de tesis, los profesores Carmelo García Barroso y M^a de Valme García Moreno, su apoyo y aportación. A ti, Carmelo, por brindarme esta oportunidad y por la confianza depositada en mí. Y a ti, Valme, por todo lo que me has enseñado durante estos años, por tu paciencia y disposición, y por ser para mí mucho más que una simple mentora, por ser una amiga.

Al profesor Jose Manuel Igartuburu, gracias por tu inestimable ayuda con el estudio de la fracción lipídica. Gracias, Buru, por tus atenciones, por lo que me has enseñado y por permitirme trabajar con los "orgánicos".

Al profesor Miguel Palma, director del proyecto del que he sido becaria.

A M^a Jesús, Manu, Pepa, Cefe... a todos, todos y cada uno de los miembros del grupo de Investigación Químico-Analítica en Vitivinicultura y Agroalimentación de la UCA. Profesores, becarios, PAS, colaboradores... a todos, gracias por acogerme en el grupo, por la ayuda prestada, por los buenos ratos.

Y finalmente, aunque no por ello menos importante, todo lo contrario, gracias a mis amigos y, por supuesto, a MI FAMILIA.

A MIS PADRES

Índice

Capítulo 1. Justificación y objetivos.....	19
1.1. Justificación	21
1.2. Objetivos	25
Capítulo 2. Fundamentos teóricos y antecedentes	29
2.1. La industria vitivinícola	31
2.1.1. Estado actual del sector vitivinícola.....	31
2.1.2. Estado del sector vitivinícola Español	33
2.1.3. Estado del sector vitivinícola en Andalucía	36
2.2. Residuos y subproductos de la industria vitivinícola	38
2.2.1. Problemática de los residuos o subproductos vitivinícolas.....	38
2.2.2. Tipos de subproductos vitivinícolas	43
2.2.3. Uso tradicional de los subproductos vitivinícolas.....	49
2.2.4. Nuevos y potenciales usos de los subproductos vitivinícolas	50
2.3. Bibliografía	63
Capítulo 3. Muestras y parámetros objeto de estudio	71
3.1. Muestras estudiadas.....	73
3.2. Preparación de muestras y extracciones.....	75
3.3. Parámetros caracterizados	77
3.4. Bibliografía	79
Capítulo 4. Caracterización del contenido polifenólico	81
4.1. Introducción	83
4.2. Determinación del contenido polifenólico total, antocianos totales y taninos totales	93
4.2.1. Materiales y métodos	93
4.2.1.1. Reactivos y disolventes	93

4.2.1.2. Metodología	93
4.2.1.3. Tratamiento estadístico	94
4.2.2. Resultados y discusión	95
4.2.3. Conclusiones	107
4.3. Caracterización del contenido en ácidos benzoicos, cinámicos y flavanoles	108
4.3.1. Materiales y método	108
4.3.1.1. Reactivos y disolventes	108
4.3.1.2. Metodología	109
4.3.1.3. Tratamiento estadístico	110
4.3.2. Resultados y discusión	110
4.3.3. Conclusiones	116
4.4. Caracterización del contenido en flavonoles y antocianinas	117
4.4.1. Materiales y método	117
4.4.1.1. Reactivos y disolventes	117
4.4.1.2. Metodología	118
4.4.1.3. Tratamiento estadístico	119
4.4.2. Resultados y discusión	119
4.4.3. Conclusiones	129
4.5. Conclusiones generales	130
4.6. Bibliografía	132
Capítulo 5. Caracterización del contenido en ácidos orgánicos	135
5.1. Introducción.....	137
5.2. Caracterización	139
5.2.1. Materiales y métodos	139
5.2.1.1. Reactivos y disolventes	139
5.2.1.2. Metodología	140
5.2.1.3. Tratamiento estadístico	140

5.2.2. Resultados y discusión	141
5.2.3. Conclusiones	147
5.3. Bibliografía	149
Capítulo 6. Caracterización del contenido en aminoácidos	151
6.1. Introducción.....	153
6.2. Caracterización	155
6.2.1. Materiales y métodos	155
6.2.1.1. Reactivos y disolventes	155
6.2.1.2. Metodología	155
6.2.1.3. Tratamiento estadístico	156
6.2.2. Resultados y discusión	156
6.2.3. Conclusiones	163
6.3. Bibliografía	164
Capítulo 7. Estudio de la actividad antioxidante	165
7.1 Desarrollo de metodología	167
7.1.1. Introducción	167
7.1.2. Materiales y método.....	172
7.1.2.1. Reactivos y disolventes	172
7.1.2.2. Muestras	172
7.1.2.3. Método	173
7.1.2.4. Análisis estadístico	175
7.1.3. Resultados	175
7.1.3.1. Estudio de la linealidad	175
7.1.3.2. Estudio de los tiempos de reacción	179
7.1.3.3. Simplificación del método	182
7.1.3.4. Estudio de la repetibilidad	185
4.1.4. Conclusiones	186

7.2. Medida de la actividad antioxidante para los subproductos estudiados ..	188
7.2.1. Introducción	189
7.2.2. Materiales y métodos	189
7.2.2.1. Reactivos y disolventes	189
7.2.2.2. Metodología	189
7.2.2.3. Tratamiento estadístico	189
7.2.3. Resultados y discusión	190
7.2.4. Conclusiones	193
7.3. Bibliografía	194
Capítulo 8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas	199
8.1. Introducción.....	201
8.2. Caracterización	206
8.2.1. Materiales y métodos	206
8.2.1.1. Muestras	206
8.2.1.2. Reactivos y disolventes	206
8.2.1.3. Metodología	207
8.2.1.4. Tratamiento estadístico	209
8.2.2. Resultados y discusión	210
8.2.2.1. Extracción del aceite	210
8.2.2.2. Contenido en ácidos grasos	211
8.2.2.3. Contenido en tocoferoles	216
8.2.3. Conclusiones	223
8.3. Bibliografía	225
Capítulo 9. Estudio de la viabilidad del proceso de deshidratación por secado en cámara climática como método para la conservación de los orujos.....	229
9.1. Introducción.....	231
9.2. Estudio del proceso de secado	234

9.2.1. Materiales y métodos	234
9.2.1.1. Muestras	234
9.2.1.2. Reactivos y disolventes	234
9.2.1.3. Metodología	234
9.2.1.4. Tratamiento estadístico	235
9.2.2. Resultados y discusión	235
9.2.3. Conclusiones	246
9.3. Bibliografía	247
Capítulo 10. Aplicabilidad cosmética	249
10.1. Fundamentos de cosmética.....	251
10.2. Utilización de la uva, el vino y sus derivados en cosmética	256
10.3. Potencialidad cosmética de los subproductos en base a los analitos estudiados.....	259
10.4. Bibliografía	269
 CONCLUSIONES	 273

CAPÍTULO 1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS.

1.1. JUSTIFICACIÓN.

La industria vitivinícola tiene una gran relevancia a nivel mundial. Para algunos países productores, como España, este sector además de ser de gran importancia desde un punto de vista económico y productivo, lleva también implícita una componente social y cultural a destacar.

Una problemática asociada a la industria vitivinícola es la gran cantidad de subproductos o residuos que genera. Cada año se producen millones de toneladas de subproductos o residuos procedentes de la industria vitivinícola. Sólo en nuestro país se producen de dos a tres millones de toneladas anuales. La gestión de estos subproductos o residuos implica problemáticas y consideraciones tanto económicas como medioambientales.

Actualmente, las políticas van encaminadas a mejorar la eficiencia de los recursos naturales y a minimizar la producción de residuos. De esta manera se pretende convertir los residuos en nuevos recursos materiales, disminuyendo así el impacto medioambiental. A partir de esta consideración, se han estado estudiando muchos de los residuos generados por la industria agroalimentaria. En los últimos tiempos ha habido un creciente interés por los subproductos o residuos de la industria vitivinícola, ya que se han encontrado en ellos importantes cantidades de sustancias de gran interés por su potencial saludable. Buscar y encontrar estrategias para aprovechar al máximo los recursos materiales contenidos en los subproductos o residuos vitivinícolas, implicaría, por un lado, revalorizar dichas materias, mejorando así el rendimiento económico del sector, y por otro, disminuir el impacto medioambiental siguiendo las actuales tendencias de recuperación y reutilización.

La industria vitivinícola de nuestra región, Andalucía, es de gran importancia, de manera que el estudio y puesta en valor de los residuos o subproductos generados por este sector no carece de interés. Resulta un primer paso imprescindible para el correcto uso y aprovechamiento de los residuos o subproductos vitivinícolas, realizar una caracterización previa de los mismos. El presente trabajo se centra en el estudio y caracterización de residuos o subproductos procedentes de la industria enológica andaluza. Entre los subproductos o residuos generados en las distintas etapas del proceso de elaboración del vino, se ha destacado y considerado para su estudio a dos de ellos: orujos y uvas de aclareo.

- **Orujos:**

Los orujos son unos de los subproductos más importantes, en cuanto a que son los subproductos mayoritarios, los más abundantes en cantidad generados durante el proceso de vinificación. Aproximadamente el 20% del peso de vendimia se convierte en orujos. Si bien es cierto que hasta el momento han sido uno de los subproductos más estudiados, hay que tener en cuenta que la composición de los orujos, al igual que ocurre con la de las uvas, depende de diversos factores: variedad de uva, factores medioambientales de cultivo como la temperatura, luz, altitud, suelo, agua, etc^{1,2,3,4}, así como del tipo de vinificación seguido⁵. Se sabe, por ejemplo, que la temperatura influye notablemente en el contenido de antocianos⁶, o que existe una relación positiva entre la exposición a la luz y la acumulación de flavonoles^{7,8}. Por este motivo

¹ Berli, F. J. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2011, **59**, 4874-4884.

² González-Centeno, J. *Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 11579-11587.

³ Obrique-Slier, E. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2012, **48**, 134-141.

⁴ Obrique-Slier, E. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2013, **54**, 404-413.

⁵ Gómez-Plaza, E. *et al.*, *Food Chem.*, 2006, **97**, 87-94.

⁶ Mori, K. *et al.*, *Sci. Hortic.*, 2005, **105**, 319-330.

⁷ Cortell, J. M. and Kennedy, J. A., *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 8510-8520.

⁸ Downey, M. O. *et al.*, *Austr. J. Grape Wine Res.*, 2004, **10**, 55-73.

muchos especialistas en la materia coinciden en considerar importante el hecho de conocer las particularidades de cada orujo, en lo que a composición se refiere, dadas por la variedad de uva de origen o por las condiciones especiales de cultivo^{9,10,11,12,13,14}.

En Andalucía existe una alta actividad vitivinícola por lo que los restos y subproductos que se generan son considerablemente altos. Además, las particularidades de Andalucía en cuanto a horas lumínicas y condiciones climatológicas (temperatura, pluviosidad, etc.), unido a la importancia del sector y a que no existen referencias sobre la caracterización de orujos procedentes de la industria enológica andaluza, han motivado este estudio. De esta forma podemos determinar qué variedades de nuestro entorno resultan más interesante por su composición en compuestos bioactivos o aquellas que destaquen por algún parámetro de interés en concreto.

- Uvas de aclareo.

La práctica del aclareo de racimos es cada vez más común en zonas de climas cálidos, donde se producen excesos de producción, como es el caso de España. La sobreproducción no sólo puede constituir un problema por las limitaciones impuestas por normativa europea para la organización común del mercado vitivinícola, sino que también se relaciona con un detrimento en la calidad de la uva. El aclareo se impone en la vitivinicultura a desarrollar en la elaboración de vinos de alta gama o de autor. Con el aclareo, se eliminan, ya sea de forma manual o mecánica, un cierto número de

⁹ Antonioli, A. *et al.*, *Food Chem.*, 2015, **178**, 172-178.

¹⁰ de la Cerda-Carrasco, A. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2015, **95**, 1521-1527.

¹¹ García-Becerra, L. *et al.*, *Food Chem.*, 2016, **194**, 1081-1088.

¹² Rockenbach, I. I. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **127**, 174-179.

¹³ Ruberto, G. *et al.*, *Food Chem.*, 2007, **100**, 203-210.

¹⁴ Sousa, E. C. *et al.*, *Food Sci. Tech.*, 2014, **34**, 135-142.

racimos antes de la maduración, disminuyendo el rendimiento de la cepa para conseguir así una mayor calidad del producto. Reequilibrando la relación entre la componente vegetativa y productiva de la cepa se asegura una maduración óptima¹⁵.

Los racimos de aclareo son habitualmente desechados. Su estudio o utilización no han sido, hasta el momento, foco de atención para la comunidad científica. Sólo hemos podido encontrar una referencia aludiendo a este tipo de residuo y su posible utilización; para la obtención de aceite de pepita¹⁶. Dada la escasez de información, consideramos importante caracterizar este tipo de residuo para conocer su utilidad como fuente de compuestos bioactivos de interés, buscando así alternativas para su utilización y revalorización.

En cuanto a las variedades de uva cuyos subproductos han sido objeto de estudio en el presente trabajo, decir que se seleccionaron cinco variedades de uva tinta. Aunque las variedades blancas han predominado siempre en nuestra región, las variedades de uva tinta se estuvieron cultivando en Andalucía hasta el siglo XIX y durante el siglo XX prácticamente desaparecieron¹⁷. En la actualidad, las tendencias del mercado y la búsqueda de diversificación de productos, han dado lugar a que se hayan vuelto a cultivar dichas variedades, aumentándose su producción de forma muy notable. Las variedades tintas mayoritarias son cabernet sauvignon, syrah, merlot y tempranillo, ocupando el 81% de la superficie de uva tinta plantada en Andalucía¹⁸. Las uvas de variedades tintas contienen ciertos polifenoles, con actividad biológica, no

¹⁵ García-Escudero Domínguez E. *Libro de Actas del XIV Congreso Nacional de Enólogos*, 2008.

¹⁶ Rubio, M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 2812-2815.

¹⁷ Guerrero, R. F. *et al.*, *Food Chem.*, 2009, **112**, 949-955.

¹⁸ Consejería de Agricultura, Pesca y Medio Ambiente. <http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&url=list.jsp&table=11030&element=852441&ec=subsector&subsector=60&CODTIPOESTUDIO=1>

presentes en las blancas; este es el caso de los antocianos. Un mayor y diverso contenido polifenólico de partida, unido al auge de estas variedades tintas en nuestra comunidad son las causas de la elección de tintas para este estudio.

Es interesante, por tanto, conocer la composición de los subproductos o residuos en relación a compuestos bioactivos de interés diverso. Y dada la alta diversificación vitícola, en cuanto a variedades de uvas se refiere y a su vinificación, es interesante igualmente, comprobar y comparar los distintos restos o subproductos que resulten que puedan tener un mayor o menor potencial para su utilización, a fin de hacer un buen uso y aprovechar al máximo los subproductos o residuos de la diversa actividad vitivinícola andaluza.

1.2. OBJETIVOS.

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo fundamental de este estudio ha sido caracterizar los compuestos de interés en dos tipos de subproductos, de potencial interés, en la industria enológica andaluza: uvas de aclareo y orujos. Así, para el desarrollo de este trabajo, se han fijado los siguientes objetivos específicos:

1. Revisar la metodología existente para el estudio de los analitos de interés, con la finalidad de utilizar aquellos métodos más adecuados. Poner a punto la metodología seleccionada o desarrollarla en aquellos casos que ha sido necesario.
2. Caracterizar muestras de orujos, de distintas variedades abundantemente cultivadas en Andalucía, en compuestos bioactivos de interés. El objetivo es disponer de la información necesaria para su correcto aprovechamiento y utilización. Este estudio se ha desarrollado

en varias vendimias a fin considerar la posible variabilidad entre distintas campañas.

3. Caracterizar muestras de uvas de aclareo, de distintas variedades, en compuestos de interés, con vistas a estudiar la posible utilización de estos residuos como fuente de compuestos de interés, buscando el potencial para su utilización y revalorización.
4. En base a los resultados obtenidos en la caracterización, y a partir de una investigación bibliográfica, considerar la posible aplicabilidad de los subproductos estudiados en la industria cosmética, valorando así una de sus posibles utilidades prácticas.

1.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Antoniolli, A., Fontana, A. R., Piccoli, P., & Bottini, R. (2015). Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec. *Food Chemistry*, 178, 172-178.
- Berli, F. J., Fanzone, M., Piccoli, P., & Bottini, R. (2011). Solar UV-B and ABA are involved in phenol metabolism of vitis vinifera L. Increasing biosynthesis of berry skin polyphenols. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(9), 4874-4884.
- Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. Observatorio de precios y mercado. URL: [http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/](http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/observatorio/servlet/FrontController?action=RecordContent&url=list.jsp&table=11030&element=852441&ec=subsector&subsector=60&CODTIPOESTUDIO=1) FrontController?action=RecordContent&url=list.jsp&table=11030&element=852441&ec=subsector &subsector=60&CODTIPOESTUDIO=1 [Consulta: septiembre 2015].
- Cortell, J. M., & Kennedy, J. A. (2006). Effect of shading on accumulation of flavonoid compounds in (Vitis vinifera L.) Pinot noir fruit and extraction in a model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(22), 8510-8520.
- De la Cerda-Carrasco, A., López-Solís, R., Nuñez-Kalasic, H., Peña-Neira, A., & Obreque-Slier, E. (2015). Phenolic composition and antioxidant capacity of pomaces from four grape varieties (Vitis vinifera L.). *Journal of the science of food and agriculture*, 95, 1521-1527.
- Downey, M. O., Harvey, J. S., & Robinson, S. P. (2004). The effect of bunch shading on berry development and flavonoid accumulation in Shiraz grapes. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 10(1), 55-73.
- García-Becerra, L., Mitjans, M., Rivas-Morales, C., Verde-Star, J., Oranday-Cárdenas, A., & Vinardell María, P. (2016). Antioxidant comparative effects of two grape pomace Mexican extracts from vineyards on erythrocytes. *Food Chemistry*, 194, 1081-1088.
- García-Escudero Domínguez, E. El control del rendimiento en el cultivo de la vid mediante la utilización del aclareo de racimos. *Libro de Actas del XIV Congreso Nacional de Enólogos*, 2008.
- Gómez-Plaza, E., Miñano, A., & López-Roca, J. M. (2006). Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. *Food Chemistry*, 97(1), 87-94.
- González-Centeno, M. R., Jourdes, M., Femenia, A., Simal, S., Rosselló, C., & Teissedre, P. (2013). Characterization of polyphenols and antioxidant potential of white grape pomace byproducts (Vitis vinifera L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11579-11587.

1. Justificación y objetivos

- Guerrero, R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, A., García-Barroso, C., & Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112(4), 949-955.
- Obreque-Slier, E., López-Solís, R., Castro-Ulloa, L., Romero-Díaz, C., & Peña-Neira, Á. (2012). Phenolic composition and physicochemical parameters of Carménère, Cabernet Sauvignon, Merlot and Cabernet Franc grape seeds (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 48(1), 134-141.
- Obreque-Slier, E., Peña-Neira, Á., López-Solís, R., Cáceres-Mella, A., Toledo-Araya, H., & López-Rivera, A. (2013). Phenolic composition of skins from four Carmenet grape varieties (*Vitis vinifera* L.) during ripening. *LWT - Food Science and Technology*, 54(2), 404-413.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliar, V., Genovese, M. I., Goncalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127(1), 174-179.
- Ruberto, G., Renda, A., Daquino, C., Amico, V., Spatafora, C., Tringali, C., & Tommasi, N. D. (2007). Polyphenol constituents and antioxidant activity of grape pomace extracts from five Sicilian red grape cultivars. *Food Chemistry*, 100(1), 203-210.
- Rubio, M., Alvarez-Ortí, M., Andrés Alvarruiz, Fernández, E., & Pardo, J. E. (2009). Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2812-2815.
- Sousa, E. C., Uchôa-Thomaz, A. M. A., Carioca, J. O. B., de Moraes, S. M., de Lima, A., Martins, C. G., Alexandrino, C. D., Ferreira, P. A. T., Rodrigues, A. L. M., Rodrigues, S. P., Silva, J. N., & Rodrigues, L. L. (2014). Chemical composition and bioactive compounds of grape pomace (*Vitis vinifera* L.), Benitaka variety, grown in the semiarid region of Northeast Brazil. *Food Science and Technology*, 34(1), 135-142.

CAPÍTULO 2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS Y ANTECEDENTES.

2.1. LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA.

El cultivo de la vid y la vinificación de su fruto son conocidos desde tiempo ancestrales. Mesopotámica, egipcia, fenicia, griega, romana; todas las grandes civilizaciones de la historia han elaborado vino, convirtiéndose éste no sólo en una bebida, sino también en un elemento de gran simbolismo al formar parte de ceremonias, ritos y celebraciones.

Consecuentemente, el vino lleva heredado consigo, tanto en su elaboración como en su consumo, un importante componente cultural y tradicional. Para la cuenca mediterránea, la vid ha sido y es, junto al cereal y la aceituna, uno de los principales cultivos, siendo la producción, consumo y comercio del vino de enorme importancia. El vino es considerado un alimento y el consumo moderado de éste constituye una de las bases de la tan afamada dieta mediterránea. Cada vez son más conocidas las propiedades beneficiosas que el vino, consumido de forma moderada, aporta a la salud del consumidor.

Sin lugar a duda, la industria del vino tiene una gran relevancia económica, social y cultural en todo el mundo, constituyendo un importante motor socioeconómico para las regiones productoras.

2.1.1. Estado actual del sector vitivinícola.

Actualmente, el cultivo de la vid se presenta en grandes extensiones a nivel mundial, ocupando una superficie de 7.573.000 hectáreas en el año 2014, según datos de la Organización Internacional de la Viña y el Vino (OIV). La producción mundial de vino, en este año, se estimó en 270 millones de hectolitros y el consumo en 240

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

millones. La producción Europea, si bien a la baja, siguió ocupando el primer puesto en el ranking en cuanto a productividad, siendo Francia con 46,2 millones de hectolitros el mayor productor, seguido de Italia y España. Por otro lado, los países productores del hemisferio sur así como Estados Unidos, continuaron en 2014 mostrando un creciente progreso en producción, consolidándose como productores emergentes.

En cuanto al consumo, el mercado no se ha recuperado desde el comienzo de la crisis económica y financiera originada en 2008. En Europa, países tradicionalmente consumidores como Francia, Italia o España han estado disminuyendo el consumo durante los últimos años. China, que mostró una marcada tendencia creciente en el consumo de vino durante los primeros años de este siglo, ha experimentado una ligera regresión. Sin embargo, algunos países de Sudamérica como Argentina, Chile y Brasil, junto a Sudáfrica, registraron en 2013 un aumento del consumo. El aumento en el consumo de algunos países ha paliado ligeramente el descenso en otros, consiguiéndose una estabilización global del mercado desde 2009, si bien no se acerca a las cuotas de mercado anteriores a la crisis ni a la tendencia alcista de entonces. Entre los principales mercados vinícolas del mundo, los cinco que encabezan la lista en términos de valor y litros, y que abarcan casi la mitad de todas las importaciones son: EE.UU, Reino Unido, Alemania, Canadá y China¹.

¹ OIV. Organización Internacional de la Viña y el Vino. URL: <http://www.oiv.int/oiv/info/espublications/statistiques>

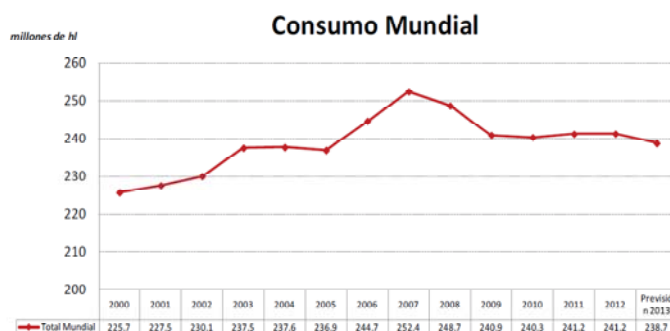


Gráfico perteneciente a la OIV.

2.1.2. Estado del sector vitivinícola Español.

España es un país de importante tradición vitivinícola. Es el primer viñedo del mundo, con 951.693 hectáreas plantadas actualmente, repartidas entre todas sus comunidades autónomas, siendo Castilla la Mancha la principal región productora seguida de Extremadura, Cataluña y Valencia². Sin embargo, las medidas establecidas de acuerdo a la nueva normativa europea regulada por el reglamento (CE) nº 479/2008 del consejo, de 29 de abril de 2008, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola³, han provocado una disminución acusada de las hectáreas cultivadas en los últimos años. Esta normativa europea, recogida por el Real Decreto 1244 /2008, de 18 de julio⁴, estableció ayudas para el arranque de viñedos durante las campañas 2008/2009, 2009/2010, y 2010/2011, con la finalidad de regular el potencial productivo y eliminar el mercado de excedentes. Dichas ayudas, unidas a la situación de crisis económica global, de la que España se ha visto fuertemente afectada, han

² FEV. Federación Española del Vino. URL: www.fev.es

³ DOUE-L-2008-81028

⁴ BOE-A-2008-12387

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

hecho que en los últimos años muchos pequeños viticultores hayan optado por el arranque o abandono de sus viñedos.

Aun así, en 2013 España alcanzó una cifra record de producción con 52,5 millones de hectolitros de vino y mosto. Las primeras estimaciones hechas públicas en relación a la producción vitivinícola para la vendimia 2015 (campaña 2015/2016), la establecen en 42,94 millones de hectolitros de vino y mosto.

En 2014, según datos FEV, se exportaron 21,8 millones de hectolitros, de forma que España se convirtió en el primer exportador mundial en términos de volumen, aunque tercero en términos de valor. Países como Francia, Italia, Portugal y Alemania son los principales clientes en volumen y Alemania, Reino Unido y EE.UU, entre otros, en valor.

Según el Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio ambiente, España cuenta con 90 zonas de producción de vinos de calidad con Denominación de Origen Protegida (DOP), de las cuales, tradicionalmente se han considerado 69 con Denominación de Origen (D.O.), 14 Vinos de Pago (V.P.) y 7 Vinos de Calidad con indicación geográfica (V.C.), todas ellas enmarcadas ya, según la normativa recogida en el Reglamento (CE) 479/2008, en la categoría de Vinos con Denominación de Origen Protegida. La otra figura que incluye el reglamento es la de Indicación Geográfica Protegida (IGP), con requisitos similares aunque menos exigentes a los de las DOP. España posee 44 IGP, indicaciones conocidas anteriormente como Vinos de la Tierra. Las DOP e IGP constituyen un sistema para el reconocimiento de una calidad diferenciada, debidas al medio geográfico en el que se producen las materias primas, se elaboran los productos y a la influencia del factor humano que participa en las mismas.

En relación a las variedades cultivadas en nuestro país, el 53% de las variedades de uvas plantadas en España son variedades tintas, destacando entre ellas la variedad tempranillo que representa un 22% de la superficie total de viñedo y un 41% de la superficie total de variedades tinta. Dentro de las variedades tintas, le siguen en importancia las variedades bobal, garnacha tinta, monastrell, cabernet sauvignon y syrah. Es la variedad airén la más importante en cuanto a variedades blancas se refiere, representado el 23% de la superficie total del viñedo existente en nuestro país y constituyendo la mitad de la superficie total de uva blanca plantada en España. En los últimos años, ha habido una tendencia general creciente de variedades tintas frente a las blancas. Entre las variedades que más han incrementado su superficie desde el año 2000 se encuentran la tempranillo, syrah, verdejo, cabernet sauvignon y palomino⁵.

Si atendemos al consumo de vino entre los españoles, según datos del Observatorio Español del Mercado del Vino (OeMv), en el año 2014 se produjo una caída del consumo del 4,3%, que equivale en valor a 1023,9 millones de Euros, consumiéndose 395,7 millones de litros. Se consumió menos cantidad de vino pero más caro, ya que aumentaron las ventas de vinos con DOP. En 2014 se consumió más vino tinto que blanco o rosado, suponiendo el 74,5% del volumen vendido de vinos con DOP y el 54,6% del volumen de vinos sin DOP. Por otro lado, el 99% de los vinos con DOP consumidos fueron nacionales y el 78% de los vinos sin DOP⁶.

Todos estos datos muestran que pese a la coyuntura de crisis económica o a los recortes impuestos por normativa europea, el sector vitivinícola español ha sabido mantenerse y goza, en la actualidad, de buena salud, siendo uno de los más importantes, no sólo en cuanto a historia o tradición se refiere, sino también desde un

⁵ MAGRAMA. URL: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/>

⁶ OeMv. Observatorio Español del Mercado del Vino. URL: <http://www.oemv.es/esp/consumo-de-vino-en-hogares-132p.php>

punto de vista productivo y económico. Constituido por más de 4000 empresas y gran número de cooperativas agrarias, el sector vitivinícola español se caracteriza por su carácter exportador; se exporta más del 50% de la producción, proporcionando a nuestro país cerca del 1% de su PIB.

2.1.3. Estado del sector vitivinícola en Andalucía.

Los orígenes de la vitivinicultura en Andalucía se remontan a las primeras civilizaciones asentadas en nuestra tierra. El sector vitivinícola andaluz es de relevante importancia sociocultural y, por supuesto, económica para la región. Andalucía cuenta con alrededor de 30.000 hectáreas de cultivo dedicadas a la vid, aunque la superficie plantada se ha visto bastante mermada, en los últimos años, por la política comunitaria de reconversión del viñedo. Según datos de la Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural de la Junta de Andalucía, anualmente se obtienen unas 187.000 toneladas de uva destinadas a elaborar vino, de las que se genera en torno a 1 millón de hectolitros.

Las zonas del marco de Jerez en Cádiz, Montilla-Moriles en Córdoba, el Condado de Huelva y Málaga, son las más emblemáticas y de mayor relevancia en producción vitivinícola. La provincia de Cádiz concentra el 38% de la producción, Córdoba el 37% y Huelva el 18%. Los vinos andaluces se basan, principalmente, en la tradición y la calidad. Buen ejemplo de ello son las 7 Denominaciones de Origen Protegidas que tiene, de las cuales 5 de ellas forman parte de las más antiguas Denominaciones de Origen reconocidas en España. Por otra parte, nuestra comunidad cuenta con el mayor número de vinos con Indicaciones Geográficas Protegidas a nivel nacional, ya que son 16 las zonas con IGP reconocidas. El 75% de los vinos producidos

en Andalucía se elaboran bajo el amparo de alguna mención de calidad⁷. Las variedades de uva plantadas en Andalucía han sido, principalmente y de forma tradicional, blancas. Sin embargo, en las últimas décadas, las tendencias del mercado unidas a la motivación por la innovación y diversificación de productos, han hecho que aumentara de forma significativa el cultivo de variedades tintas y la elaboración de dichos caldos en nuestra región.

En lo que se refiere al mercado vitivinícola andaluz, al igual que ocurre en el resto de España, el consumo interior ha ido disminuyendo, sin embargo han aumentado las exportaciones. Conocidos a nivel mundial, los vinos andaluces han sido, históricamente, ampliamente exportados, teniendo una gran fama y prestigio en el exterior. En 2014 Andalucía exportó más de 100 millones de Euros en vino, siendo Cádiz la provincia que abarcó más mercado con el 83% en valor de esas exportaciones. A ella le siguieron Málaga y Córdoba. El principal mercado de los vinos andaluces se localiza en Reino Unido, Países Bajos y EE.UU.

Por consiguiente, al igual que en España de forma general, en Andalucía, de forma particular, el sector vitivinícola se muestra como una importante industria fuente de riqueza económica. Actualmente, la tremenda situación de desempleo que aqueja de forma especial a esta comunidad, hace que haya que destacar el factor social que la industria vitivinícola lleva implícito, con la generación de una importante cantidad de mano de obra para las regiones productoras y aledañas. Aunque el consumo interno se haya ido mermando en los últimos años, la gran tradición exportadora de los vinos andaluces no se ha visto mitigada con el paso del tiempo, todo lo contrario, aumentando no sólo en volumen o en valor, sino también en prestigio en internacionalización.

⁷ Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. URL:

http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/noticias/_detalles.html?uid=d81f9aa5-900a-11e4-8a6d-1a4a0f000f45

2.2. RESIDUOS Y SUBPRODUCTOS DE LA INDUSTRIA VITIVINÍCOLA.

2.2.1. Problemática de los residuos o subproductos vitivinícolas.

En primer lugar, se ha de diferenciar entre el concepto de residuo y subproducto. Estrictamente, se define como:

- Residuo:

Según la R.A.E. un residuo es *“el material que queda como inservible después de haber realizado un trabajo u operación”*⁸.

La actual ley vigente en materia de residuos, la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, define el concepto de residuo como: *“cualquier sustancia u objeto que su poseedor deseché o tenga la intención o la obligación de desechar”*⁹.

- Subproducto:

La R.A.E. define subproducto como: *“en cualquier operación, producto que en ella se obtiene además del principal y que suele ser de menor valor que éste”*.

Así mismo, la actual ley de residuos, que viene a modificar la anterior ley 10/1998, incluye como novedad entre sus definiciones el concepto de subproducto y lo describe como: *“una sustancia u objeto, resultante de un proceso de producción, cuya*

⁸ Real Academia Española, 22ª ed., 2001.

⁹ BOE-A-2011-13046

finalidad primaria no sea la producción de esa sustancia u objeto, puede ser considerada como subproducto y no como residuo cuando se cumplan las siguientes condiciones:

- a) Que se tenga la seguridad de que la sustancia u objeto va a ser utilizado ulteriormente,*
- b) que la sustancia u objeto se pueda utilizar directamente sin tener que someterse a una transformación ulterior distinta de la práctica industrial habitual,*
- c) que la sustancia u objeto se produzca como parte integrante de un proceso de producción, y*
- d) que el uso ulterior cumpla todos los requisitos pertinentes relativos a los productos así como a la protección de la salud humana y del medioambiente, sin que produzca impactos generales adversos para la salud humana o el medio ambiente”.*

Por tanto, los conceptos de residuos y subproductos están fuertemente interrelacionados y un mismo material puede ser considerado residuo o subproducto en función del punto de vista tenido en cuenta y de su posterior uso. En el caso de las materias secundarias generadas a partir del proceso productivo del vino, muchas de ellas pueden considerarse residuos si atendemos a la visión del bodeguero que quiera desprenderse de ellas, pero pueden ser consideradas subproductos si el bodeguero las reutiliza u otra empresa hace uso de ellas. Por este motivo en la literatura científica podemos encontrar indistintamente referencias sobre residuos y subproductos vitivinícolas aludiendo a las mismas materias. En nuestro caso, dado que muchas de estas materias son actualmente utilizadas, aunque no ocurra siempre y aun cuando no se esté aprovechando todo su potencial, hablaremos de subproductos de la industria vitivinícola para referirnos a las materias secundarias generadas a lo largo del proceso de cultivo de la vid y elaboración del vino.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

En cualquier caso, las políticas actuales van encaminadas a disminuir la generación de residuos y aumentar su reutilización. La promulgación de la Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008¹⁰, sobre los residuos, dio lugar en nuestro ordenamiento jurídico a la Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados, que tiene por objeto regular la gestión de los residuos impulsando medidas que prevengan su generación y mitiguen los impactos adversos sobre la salud humana y el medioambiente asociados a su generación y gestión, mejorando la eficiencia en el uso de los recursos. En la actualidad, la Unión Europea está desarrollando una política decidida de uso eficiente de los recursos naturales y de revalorización de los recursos materiales, enmarcada en su estrategia Europa 2020, en la que se pretende que los residuos sean nuevos recursos materiales potenciales.

Estas nuevas tendencias políticas son sólo reflejo de la preocupación actual que la sociedad tiene hacia el medioambiente. La cada vez mayor concienciación social hacia la conservación y respeto al medioambiente, se ponen de manifiesto en la vitivinicultura con la aparición de conceptos como sostenibilidad, vitivinicultura integrada o vitivinicultura ecológica. El uso de los recursos del medio es **sostenible** si se realiza por debajo de su capacidad de renovación o sustitución. La **vitivinicultura integrada** es aquella que siendo económicamente rentable, se fundamenta en el respeto al medioambiente y en la reducción al máximo de los niveles de residuos. La **vitivinicultura ecológica** se basa en el respeto al medioambiente, cultivando la uva sin la aplicación de productos químicos de síntesis y utilizando levaduras naturales o autóctonas durante la fermentación. Se espera que en el futuro la mayor parte de la vitivinicultura, hasta ahora tradicional, pase a ser integrada.

La industria vitivinícola, si bien no es considerada como generadora de un gran impacto medioambiental, presenta la problemática de producir enormes volúmenes

¹⁰ DOUE-L-2008-82319

de subproductos. Estos suponen implicaciones desde un punto de vista medioambiental y económico, acrecentadas por la estacionalidad de su producción, ya que la mayor parte se produce durante un corto periodo de tiempo, la época de vendimia. Anualmente se generan entre 5 – 9 millones de toneladas de subproductos a nivel mundial¹¹. Sólo en nuestro país se producen de 2 a 3 millones de toneladas por año de residuos o subproductos vitivinícolas.

Los principales subproductos generados en la elaboración de vino no son peligrosos, es más, son biodegradables, pero poseen un elevado contenido en materia orgánica. El hecho de que se produzcan cantidades tan elevadas de subproductos puede provocar un efecto negativo en la flora y fauna circundantes, convirtiéndose en un problema medioambiental si estos no se gestionan.¹¹ La problemática medioambiental que se origina si no se reutilizan o gestionan los subproductos vitivinícolas puede deberse a:

- 1) Las cantidades de subproductos o residuos son tan elevadas que no pueden ser descompuestas y asimiladas al mismo ritmo que se producen por el entorno de forma natural, esto provoca que se produzca un desequilibrio del ciclo natural, de manera que se van acumulando.
- 2) Debido a la humedad que contienen estos subproductos o residuos, pueden convertirse en un foco de plagas e insectos al ser amontonados normalmente en el exterior.
- 3) Los pH ácidos y la presencia de ciertos compuestos con propiedades fitotóxicas y antibacterianas pueden provocar una contaminación del suelo¹².
- 4) Los lixiviados procedentes de los residuos y de su descomposición pueden contaminar las aguas subterráneas.

¹¹ Lafka, T. *et al.*, *Food Chem.*, 104 (2007) 1206-1214.

¹² Bustamante, M.A. *et al.*, *Waste Manage.*, 28 (2008) 372-380.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

- 5) Si estos subproductos se vertieran a cauces de ríos provocarían un gran problema medioambiental debido a la elevada demanda de oxígeno, ya sea químico o bioquímico, que implicarían por su elevado contenido en materia orgánica.

Desde el punto de vista económico, la gestión de los residuos supone un gasto para el productor ya que según la ley, si no son residuos urbanos, el generador o poseedor del residuo a de encargarse de:

- a) Realizar el tratamiento de los residuos por sí mismo.*
- b) Encargar el tratamiento de sus residuos a un negociante, o a una entidad o empresa, todos ellos registrados conforme a lo establecido en esta Ley.*
- c) Entregar los residuos a una entidad pública o privada de recogida de residuos, incluidas las entidades de economía social, para su tratamiento.*

Queda estrictamente prohibido su abandono, vertido y eliminación incontrolada. Una correcta gestión implica separar las materias en el origen y almacenarlas en buenas condiciones, todo ellos con los consiguientes costes que supone para el productor. De esta forma, el vitivinicultor está obligado a eliminar los subproductos de la vinificación, bien sea mediante la entrega de algunos de estos para la destilación o realizando una retirada bajo control.

En conclusión, es un hecho que los elevados volúmenes de subproductos generados a partir del cultivo de la vid y la elaboración de vino conllevan asociados una problemática económica y medioambiental. Consecuentemente a todo lo mencionado podemos decir que la industria vitivinícola habría de dirigir sus esfuerzos hacia no sólo una gestión adecuada de los subproductos que genera, con la intención de disminuir el impacto medioambiental, sino también a tratar de aprovechar al máximo los recursos materiales contenidos en dichos subproductos para su reutilización y

aprovechamiento. Buscar alternativas para la reutilización de estos subproductos supondría una revalorización de dichas materias, implicando un mejor rendimiento económico para la explotación vitivinícola. Paralelamente, podría repercutir desde un punto de vista social con la generación de nuevos puestos de trabajo. De esta manera, los subproductos se convertirían en nuevos recursos materiales potenciales con valor económico, además de conseguir aprovechar al máximo los recursos naturales disminuyendo también de esta forma la contaminación medioambiental.

2.2.2. Tipos de subproductos vitivinícolas.

A lo largo del proceso de elaboración del vino, se van generando distintos tipos de subproductos. Prácticamente todas las etapas en las que podemos dividir el proceso de producción implican la generación de algún tipo de subproducto, siendo algunas las más importantes en cuanto a volúmenes de subproductos se refiere. Se pasa a continuación a enumerar y describir los principales subproductos vitivinícolas, de acuerdo a como se van obteniendo cronológicamente.

Los primeros subproductos que se generan proceden de las etapas derivadas del cultivo de la vid. Todos ellos son subproductos de origen vegetal y se originan a partir de actividades de control y acondicionamiento del viñedo. Entre estas etapas de acondicionamiento podemos destacar la poda de sarmientos, el deshojado y el aclareo de racimos como principales procesos generadores de subproductos vitícolas, de los que se obtienen **sarmientos, hojas y uvas de aclareo**, respectivamente, como subproductos. Todas estas operaciones van encaminadas a establecer un equilibrio entre la parte vegetativa de la vid, su superficie foliar, y la parte productiva, los racimos de uvas, con la finalidad de obtener cosechas de mejor calidad.

La **poda de sarmientos** se realiza anualmente, generalmente en invierno, cuando la planta está en receso o inactiva, de ahí que esta operación se conozca como poda invernal. Llamamos sarmientos a las ramas de la vid que tienen al menos un año, siendo los brazos las ramas más antiguas y los pámpanos las ramas nuevas del año. Cada sarmiento posee una serie de yemas, pequeños abultamientos de los que surgirá una nueva rama. La poda de sarmientos consiste en cortar ramificaciones dejando un determinado número de yemas en la planta, controlando de esta forma, por un lado, la dirección del crecimiento y forma de la vid, y por otro lado la producción, vigorizándola, regulándola y mejorando su calidad¹³. Un viñedo en condiciones normales produce anualmente entre 2.000 y 4.000 kg de sarmientos por hectáreas, cuya presencia en las calles dificultan las operaciones de cultivo, por lo que deben ser retirados de forma manual o mecanizada¹⁴.

El **deshojado**, también conocido como defoliado, consiste en eliminar hojas de la base de los brotes, que son las más viejas y las menos activas fotosintéticamente. Eliminando hojas de la cepa, siempre y cuando se mantenga una buena correlación entre superficie foliar y producción, pueden mejorarse las condiciones de aireación e iluminación de los racimos, reduciéndose el riesgo de podredumbre y aumentando la maduración de los mismos. Esta operación ha de realizarse después del cuajado del fruto y antes del envero¹⁴.

Por su parte, el **aclareo de racimos**, es una práctica cada vez más común en zonas de climas cálidos en los que se producen excesos de producción. Consiste en la supresión, ya sea manual o mecánica, de un cierto número de racimos, disminuyendo el rendimiento de la cepa para así conseguir una mayor calidad del fruto.

¹³ Larrea, A. Hojas divulgadoras. Madrid, 1966.

¹⁴ Hidalgo, J. *Tratado de Enología*. 2ª ed, 2011.

Los siguientes subproductos a destacar se obtienen de las primeras etapas del proceso de elaboración del vino. Estos son los **raspones y orujos**. Dichos subproductos destacan en importancia, fundamentalmente los orujos, por los grandes volúmenes que se obtienen de ellos. En función del tipo de vinificación que se realice, ambos, raspones y orujos, pueden obtenerse juntos o por separado.

El **raspón**, también conocido como palillo o escobajo, es la estructura leñosa que sustenta al racimo y representa aproximadamente del 3 al 7% del peso de la vendimia. Generalmente, cuando se vinifican vinos tintos, una vez que la uva llega a la bodega se realiza una operación de molturado y despalillado, que normalmente son simultáneas. Con la molturación se rompe el hollejo para su posterior maceración y con el despalillado se separa el grano de uva y se elimina el raspón. Habitualmente esta operación se realiza de forma mecanizada por medio de una maquinaria conocida comúnmente como despalilladora. Fundamentalmente, la necesidad de eliminar el raspón antes de la maceración de la uva tinta es la de impedir que el raspón y el mosto estén mucho tiempo en contacto para que no se transmitan al mosto, procedentes principalmente de los raspones verdes, demasiados componentes que produzcan en el vino un exceso de astringencia o de sabores herbáceos. A su vez, el raspón presenta la desventaja de aumentar los volúmenes de encube y puede disminuir el grado alcohólico de vino.

En el caso de las vinificaciones de vinos blancos, aunque no siempre, depende de la metodología seguida en la vinificación, la práctica habitual es la de no despalillar. Los racimos se prensan enteros. El raspón puede facilitar el proceso de prensado de la uva mejorando el drenaje del mosto.

El **orujo** es el subproducto originado de la etapa de prensado o estrujado de la uva, que puede estar previamente fermentada o no, con la finalidad de obtener el mosto, si la uva no ha sido fermentada como ocurre usualmente en las vinificaciones

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

de vinos blancos o algunos rosados, o de obtener el vino si ha habido fermentación previa como sucede en la elaboración de tintos. El orujo está constituido por el hollejo o piel de la uva, las pepitas y en algunos casos, como mencionamos anteriormente, por el raspón. El orujo puede ser considerado como el subproducto mayoritario del proceso de vinificación de acuerdo a las cantidades obtenidas. Una media del 20% del peso de vendimia se convierte en orujos. Las cantidades de orujos pueden variar notablemente en función de multitud de factores como la variedad de uva, climatológicos y condiciones de cultivo, forma de prensado, etc. Se estima que el hollejo representa del 8 - 20% del peso de la vendimia y las pepitas del 0 - 6%.

En la elaboración de vinos blancos, tras el prensado y previo a la fermentación, se realiza una etapa conocida comúnmente como desfangado. Esta etapa puede realizarse de forma mecánica pero lo más común es realizarla por decantación. El mosto se deja reposar de forma que se irán depositando en el fondo del tanque partículas sólidas que corresponden en su mayoría a tejido vegetal, restos de hollejos y raspones, y a proteínas precipitadas procedente de la uva. Estas partículas serán más finas o groseras dependiendo de la forma por la que se ha obtenido el mosto. A este subproducto se le conoce simplemente con el nombre de **fangos**. La forma más habitual de separar los fangos decantados es mediante el trasiego de los mostos. El principal objetivo del desfangado es el de aumentar la limpidez del mosto, impidiendo que el vino pueda adquirir componentes organolépticas no deseadas por contacto con partes vegetales.

Durante el proceso de fermentación del mosto para la obtención del vino, se va depositando en el fondo de los tanques de fermentación un poso de composición heterogénea. Conocido con el nombre de **lías o heces de fermentación**, este subproducto es un residuo sólido constituido fundamentalmente por levaduras muertas, materia orgánica y sales. Las lías constituyen otro de los principales subproductos de vinificación, estimándose que se generan aproximadamente una

cantidad de lías correspondiente al 3% del peso de vendimia. Es importante, una vez concluida la fermentación, separar rápidamente las lías del vino para que estas no aporten al vino sabores u olores no deseados. La separación de las lías se realiza mediante el trasiego de los vinos.

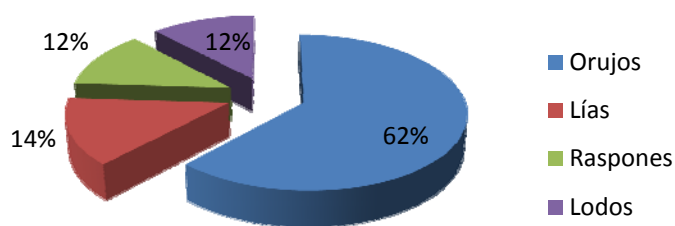
Finalmente, los últimos subproductos vitivinícolas a destacar corresponden a los obtenidos a partir de las etapas de clarificación y estabilización de los vinos. Tras la fermentación, los vinos contienen una gran cantidad de partículas en suspensión que se ponen de manifiesto por la turbidez que presentan. Durante el proceso de crianza, a lo largo del tiempo, estas partículas decantan y sedimentan de forma natural, obteniéndose **lodos** en el fondo de las barricas de crianza. No obstante, para que el vino clarifique de forma natural requiere de largos periodos de tiempo. Para agilizar este proceso y asegurar la limpidez del vino, acorde a las preferencias de los consumidores, se realizan de forma habitual una serie de procedimientos conocidos como clarificación y estabilización de los vinos. La clarificación consiste en añadir a los vinos alguna sustancia que flocule, de forma que se aglutinen sustancias coloidales que arrastren las partículas en suspensión. Los clarificantes pueden ser de origen mineral, orgánico o de síntesis. Los orgánicos son los más utilizados, siendo los principales de naturaleza proteica como la gelatina, cola de pescado, caseína, albúmina de huevo, etc. De este procedimiento se obtiene un subproducto conocido como **lodo de clarificación**. Posteriormente a la clarificación se pueden realizar filtraciones o centrifugaciones del vino para mejorar aún más su limpidez.

Tras las operaciones de clarificación y filtración, una vez limpio, es común someter el vino a procesos de estabilización para asegurar que no evolucionará de forma indeseada en la botella. Dentro de los posibles procedimientos de estabilización que se pueden realizar, la estabilización por frío es uno de los más tradicionales y generalizados. Consiste en enfriar el vino hasta temperaturas cercanas a la de congelación, consiguiendo que precipiten así las sales tartáricas. El vino está

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

generalmente saturado de sales tartáricas de forma natural, principalmente sales de bitartrato potásico y cálcico. Con el tiempo y los cambios de temperatura pueden formarse posos de cristales de sales tartáricas en la botella por precipitación. Aunque este hecho no es sinónimo de un proceso de degradación del vino ni constituye un problema organoléptico, muchos consumidores lo pueden interpretar como algo negativo, de ahí la importancia de realizar este procedimiento. Tras el proceso de estabilización, quedarán en las paredes y fondo del tanque las **sales de estabilización tartárica** que constituirían otro de los subproductos del proceso de vinificación.

En resumen, prácticamente casi todas las etapas del proceso de elaboración del vino generan algún tipo de subproducto. Los principales subproductos orgánicos de la actual industria vitivinícola son los orujos que constituyen el 62% de estos subproductos, las lías que forman en 14% y los raspones y lodos en general que suponen el 12% cada uno¹⁵.



Distribución de los principales subproductos vitivinícolas

¹⁵ Ruggieri, L. et al., *J. Clean. Prod.*, 17 (2009) 830-838.

2.2.3. Usos tradicionales de los subproductos vitivinícolas.

De forma tradicional, los principales usos que se le ha dado a los subproductos vitivinícolas han estado relacionados con la obtención de compuestos de valor enológico, siendo también utilizados como abonos, para la alimentación animal y para la obtención de energía por combustión.

Los orujos y las lías son, tradicionalmente, los subproductos de mayor y más diversificado uso. Su utilización principal está relacionada con la obtención de alcohol. Estos subproductos son enviados a las alcoholeras donde se someten a un proceso de destilación con la finalidad de obtener el alcohol que contienen. Este alcohol es de gran valor enológico ya que es el que posteriormente se utilizará para la elaboración de aguardientes, brandy, vinos generosos, etc. Del tratamiento de estos subproductos en las alcoholeras también se obtiene ácido tartárico. El ácido tartárico tiene importancia enológica ya que es el que se usa generalmente para corregir la acidez de mostos y vinos, pero también tiene importancia para otras industrias, siendo utilizado por la industria alimentaria, farmacéutica y química. Se estima que aproximadamente de cada 100 Kg de orujos procedentes de una vendimia de 12 a 13% volúmenes de alcohol, pueden obtenerse unos 4 ó 5 litros de alcohol y 3 ó 4 Kg de ácido tartárico¹⁶. El ácido tartárico, como mencionamos anteriormente, también se obtiene de la etapa de estabilización por frío.

Tras el proceso de destilación, los orujos se han venido utilizando como:

- 1) Enmienda orgánica para el suelo. Una práctica común es la de depositarlos directamente sobre el suelo.

¹⁶ Hidalgo, J. *Tratado de Enología*. 2ª ed, 2011.

- 2) Alimentación para el ganado. El orujo ha de suministrarse como alimento complementario dado su escaso valor nutritivo y mala digestibilidad.
- 3) Combustible para las calderas de las mismas alcohólicas. Para ser utilizados como fuente de energía por combustión previamente han de dejarse secar.

Los restos de la poda de sarmiento generalmente se han utilizado como fuente de energía por combustión o bien se han incorporado al terreno como enmienda orgánica. Los raspones se han utilizado con la misma finalidad previo secado de los mismos. Ninguno de estos residuos tiene especial interés como alimento para el ganado por sus elevados contenidos en lignina.

Para finalizar este apartado hay que destacar que aunque estas son las aplicaciones que tradicionalmente se les ha podido dar a los subproductos de vinificación, no siempre se ha hecho uso de ellas. No es una práctica extraña que ciertos subproductos se incineren o depositen en vertederos para su eliminación, convirtiéndose de esta forma en residuos.

2.2.4. Nuevos y potenciales usos de los subproductos vitivinícolas.

En los últimos años se ha desarrollado un creciente interés por la utilización de los subproductos vitivinícolas, explorándose diversas nuevas opciones de aplicabilidad. Entre las distintas propuestas desarrolladas podemos encontrar:

1. Utilización de los subproductos vitivinícolas para la obtención de compuestos polifenólicos.

La utilización de los subproductos vitivinícolas para la obtención de compuestos polifenólicos, ha sido la propuesta que más interés ha suscitado hasta el momento. Son muy numerosos los estudios que se han realizado en base a esta cuestión.

Los compuestos polifenólicos son metabolitos secundarios de origen vegetal¹⁷. Estos compuestos están presentes, en elevadas cantidades, en la uva y, por supuesto, en el vino¹⁸. Los efectos beneficiosos que el consumo moderado de vino tiene para la salud del consumidor, han sido atribuidos principalmente a su contenido polifenólico y especialmente a las propiedades antioxidantes que estos compuestos poseen¹⁹. Los compuestos antioxidantes son capaces de proteger los sistemas biológicos contra la acción de los radicales libres inhibiendo el estrés oxidativo. Pueden ejercer una acción de protección frente a múltiples enfermedades degenerativas en las que los radicales libres están implicados. Evidencias epidemiológicas han demostrado que el consumo de una dieta rica en compuestos antioxidantes, como los polifenoles, reduce la incidencia en varios desórdenes degenerativos como son la mutagénesis, carcinogénesis o enfermedades neurodegenerativas, así como enfermedades cardiovasculares o diabetes^{20,21,22,23,24}.

¹⁷ García-Marino, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **563**, 44-50.

¹⁸ Kanner, J. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 64-69.

¹⁹ Shrikhande, A. J., *Food Res. Int.*, 2000, **33**, 469-474.

²⁰ Alonso, Á. M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2002, **50**, 5832-5836.

²¹ Briviba, K. *et al.*, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 2814-2818.

²² De Gaetano, G. *et al.*, *Sang Thromb. Vaiss.*, 2005, **17**, 47-60.

²³ Fernández-Mar, M. I. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **130**, 797-813.

²⁴ Meyer, A. S. *et al.*, *Food Chem.*, 1998, **61**, 71-75.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

Los compuestos polifenólicos del vino tienen su origen en la uva y sólo una parte de ellos es transferida al mosto. Su extractabilidad dependerá de las condiciones de vinificación. En cualquier caso, gran parte del contenido polifenólico queda en los subproductos de vinificación, convirtiéndose estos en una potencial fuente de antioxidantes naturales^{25,26}. No sólo los orujos y lías presentan un contenido polifenólico de interés, hay estudios que muestran como raspones²⁷ y sarmientos de podas²⁸ pueden ser también buenas fuentes de compuestos polifenólicos.

En consecuencia, gracias a su actividad antioxidante, los compuestos polifenólicos presentes en los subproductos vitivinícolas podrían ser utilizados, a priori, por la industria alimentaria, cosmética o farmacéutica²⁹. No obstante, la gran mayoría de los estudios realizados hasta el momento, basados en el contenido polifenólico de los subproductos vitivinícolas, están enfocados en la utilización de los subproductos o sus extractos polifenólicos por la industria alimentaria, bien para la elaboración de alimentos funcionales, suplementos dietéticos o como aditivos.

En lo que se refiere a los alimentos funcionales, se han llevado a cabo multitud de estudios en los que se proponen utilizar los subproductos vitivinícolas para la elaboración de diversos alimentos funcionales tales como: harinas para hacer pan o repostería^{30,31,32}, productos cárnicos³³, de pescado³⁴, puré de tomate³⁵,

²⁵ Arvanitoyannis, I. S. *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2006, **41**, 475-487.

²⁶ Moure, A. *et al.*, *Food Chem.*, 2001, **72**, 145-171.

²⁷ Ruiz-Moreno, M. J. *et al.*, *Ind. Crops Prod.*, 2015, **63**, 152-157.

²⁸ Max, B. *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 2009, **43**, 129-134.

²⁹ Aliakbarian, B. *et al.*, *Journal of Supercritical Fluids*, 2012, **65**, 18-24.

³⁰ Hoyer, C. and Ross, C. F., *J. Food Sci.*, 2011, **76**, S428-S436.

³¹ Mildner-Szkudlarz, S. *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2011, **46**, 1485-1493.

³² Rosales Soto, M. U. *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2012, **47**, 592-602.

yogurt³⁶ o helado³⁷. También se han realizado estudios sobre el enriquecimiento de la alimentación para el ganado con polifenoles de subproductos vitivinícolas³⁸.

En cuanto a los suplementos dietéticos basados en los subproductos vitivinícolas, no son propuestas sino toda una realidad desde hace varios años. Por ejemplo, en el año 2000 se comercializaban ya en Estados Unidos 22 productos basados en pepitas de uva y 5 en hollejo, y parece ser que el número de productos ha ido aumentando desde entonces³⁹. Actualmente, se está considerando el uso de estos suplementos polifenólicos o nutraceuticos como inhibidores de las enzimas α -glucosidasa y α -amilasa para controlar los niveles de azúcares en sangre en personas diabéticas^{40,41}.

Finalmente, su utilización como aditivos se ha relacionado mayoritariamente con su uso como conservante, debido no sólo a las propiedades antioxidantes sino también a las propiedades antibacterianas que muchos polifenoles presentan. De este modo se toma en consideración que los polifenoles procedentes de los subproductos vitivinícolas puedan sustituir a los antioxidantes sintéticos como el butilhidroxianisol (2(3)-*t*-Butil-4-hidroxianisol o BHA) o el Butilhidroxitolueno (2,6-Di-*terc*-butil-4-metil-fenol o BHT),

³³ Sáyago-Ayerdi, S. G. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 971-976.

³⁴ Pazos, M. *et al.*, *Food Chem.*, 2005, **92**, 547-557.

³⁵ Lavelli, V. *et al.*, *Food Chem.*, 2014, **152**, 162-168.

³⁶ Tseng, A. and Zhao, Y., *Food Chem.*, 2013, **138**, 356-365.

³⁷ Sharma, A. K. *et al.*, *Journal of Food Science and Technology*, 2013, 1-5.

³⁸ Ishida, K. *et al.*, *Anim. Sci. J.*, 2015, **86**, 260-269.

³⁹ Yilmaz, Y. and Toledo, R. T., *Journal of Food Composition and Analysis*, 2006, **19**, 41-48.

⁴⁰ Sri Harsha, P. S. C. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2013, **140**, 263-268.

⁴¹ Lavelli, V. *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2015, **50**, 1182-1189.

ampliamente utilizados por la industria alimentaria y generadores, en la actualidad, de una gran controversia en cuanto a su inocuidad.

Su aplicabilidad como aditivo también se ha encaminado a su utilización como inhibidor de la formación de acrilamidas. Las acrilamidas son compuestos que se pueden generar en los alimentos por tratamientos térmicos, como resultado de la reacción de Maillard, en la que los grupos carbonilos de los azúcares reaccionan con los grupos amino de los aminoácidos. Las acrilamidas están consideradas como compuestos cancerígenos para el ser humano^{42,43}.

Otra de sus aplicaciones como aditivos alimentarios a destacar, es la de su uso como colorantes. En este caso son los extractos de antocianinas o antocianos, un grupo de polifenoles pertenecientes a la familia de los flavonoides, los que generan el interés. Este tipo de polifenoles es el responsable de la coloración roja, rosa, azul y púrpura de muchas frutas, flores y vegetales, entre ellos la coloración roja de la uva tinta. Su utilización como colorante alimentario implicaría por un lado poder utilizar un aditivo natural, ampliamente demandados por los consumidores frente a los sintéticos, y por otro, aportar al producto efectos beneficiosos para la salud, ya que este tipo de polifenoles también presentan, entre otras, actividad antioxidante. Sin embargo, pese a su gran potencial, su uso se ve limitado por su baja estabilidad durante la formulación, procesamiento y almacenaje de muchos productos alimentarios. Su estabilidad depende de factores como el pH, la temperatura, la presencia de oxígeno, enzimas, etc. Por este motivo está siendo actualmente objeto de estudio su aplicación y formas de estabilización^{44,45,46}.

⁴² Xu, C. *et al.*, *Food Chem.*, 2015, **182**, 200-208.

⁴³ Zhu, F. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2009, **89**, 1674-1681.

⁴⁴ Camire, M. E. *et al.*, *J. Food Sci.*, 2002, **67**, 438-441.

⁴⁵ Malien-Aubert, C. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 170-176.

2. Obtención de fibra alimentaria a partir de los subproductos vitivinícolas.

La fibra alimentaria se puede definir como la parte comestible de las plantas que no puede ser digerida y absorbida por el intestino delgado humano y con la que se produce una fermentación parcial o total en el intestino grueso⁴⁷. Desde un punto de vista químico se trata de carbohidratos o análogos como la celulosa, hemicelulosa, lignina, pectina, β -glucanos y gomas. Se ha reconocido que la ingesta de fibra alimentaria conlleva múltiples efectos beneficiosos para la salud. La fibra alimentaria produce una mejora de la actividad gastrointestinal. Por un lado ayuda a un mejor tránsito intestinal y aumenta la sensación de saciedad, y por otro, estimula beneficiosamente la microbiota intestinal⁴⁸. También se le ha atribuido un efecto moderador de la respuesta de la insulina posprandial y la capacidad de reducir los niveles de colesterol en sangre⁴⁹, correlacionándose todos estos efectos con una disminución de los riesgos asociados a enfermedades cardiovasculares, cáncer o diabetes^{50,51}.

Actualmente, y debido a las propiedades beneficiosas que la fibra alimentaria puede aportar a la salud, las investigaciones basadas en la obtención de fuentes de fibra alimentaria y su aplicabilidad en la elaboración de alimentos funcionales están en pleno auge. Diversas investigaciones han puesto de manifiesto como ciertos subproductos vitivinícolas como los orujos o los raspones presentan elevados contenidos en fibra alimentaria^{52,53} que pueden

⁴⁶ Vatai, T. *et al.*, *J. Supercritical Fluids*, 2008, **45**, 32-36.

⁴⁷ AACC report, *American Association of Cereal Chemists*, 2001, **46**, 112-126.

⁴⁸ Pozuelo, M. J. *et al.*, *J. Food Sci.*, 2012, **77**, H59-H62.

⁴⁹ Zhu, F. *et al.*, *Food Chem.*, 2015, **186**, 207-212.

⁵⁰ Deng, Q. *et al.*, *Food Res. Int.*, 2011, **44**, 2712-2720.

⁵¹ Pérez-Jiménez, J. *et al.*, *Nutrition*, 2008, **24**, 646-653.

⁵² Llobera, A. and Cañellas, J., *Food Chem.*, 2007, **101**, 659-666.

⁵³ Llobera, A. and Cañellas, J., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2008, **43**, 1953-1959.

ser de gran interés para las tendencias de la actual industria alimentaria. La fibra alimentaria contenida en los subproductos vitivinícolas se puede encontrar además asociada a polifenoles, de forma que se presenta como una fibra alimentaria con capacidad antioxidante, reuniendo las propiedades de ambos. El aporte de este tipo de fibras a los alimentos puede presentar una doble función: aumentar las propiedades saludables del alimento y ayudar a su conservación durante el almacenaje. Hasta el momento, se han desarrollado varias propuestas de aplicación de fibra alimentaria de subproductos vitivinícolas para la elaboración de distintos alimentos funcionales como galletas⁵⁴, productos cárnicos⁵⁵, de pescado⁵⁶, yogurt y aderezos para ensalada⁵⁷.

3. Uso del aceite de pepita de uva con fines alimentarios o cosméticos.

El aceite de la pepita de uva puede extraerse mediante prensado en frío o mediante disolventes orgánicos. Las investigaciones llevadas a cabo sobre el aceite de pepita de uva han demostrado que presenta una composición nutricional muy beneficiosa para la salud. Los principales beneficios vienen dados por su alto contenido en ácidos grasos insaturados, encontrándose como ácido graso mayoritario el ácido linoleico. Se ha determinado que su contenido en ácidos grasos insaturados supera el 86% del contenido total, siendo éstos ácidos grasos esenciales⁵⁸. Una dieta rica de ácidos grasos insaturados frente a

⁵⁴ Mildner-Szkudlarz, S. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2013, **93**, 389-395.

⁵⁵ Sáyago-Ayerdi, S. G. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2009, **42**, 971-976.

⁵⁶ Ribeiro, B. *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **48**, 10-21.

⁵⁷ Tseng, A. and Zhao, Y., *Food Chem.*, 2013, **138**, 356-365.

⁵⁸ Yu, J. and Ahmedna, M., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2013, **48**, 221-237.

los saturados, se ha relacionado con menores índices de colesterol y una disminución de la incidencia de cáncer^{59,60}.

El aceite de pepita contiene, además de compuestos polifenólicos, otros compuestos con propiedades antioxidantes como tocoferoles y tocotrienoles^{61,62,63}. Las virtudes que su composición química les proporciona, hacen que este aceite pueda ser utilizado tanto por la industria alimentaria, por su valor nutricional, como por la industria cosmética, por su poder regenerador, lo que ha provocado que cada vez sean más demandados por la sociedad.

4. Utilización de los subproductos vitivinícolas para la elaboración de fertilizantes.

La actual tendencia hacia una agricultura integrada ha hecho que se esté estudiando la posibilidad de reemplazar los fertilizantes químicos, extensamente utilizados en la producción agrícola, por fertilizantes naturales. En los subproductos vitivinícolas podemos encontrar una importante fuente de materia orgánica, macronutrientes como el potasio, y cantidades significativas de nitrógeno y fósforo, todos ellos importantes para la fertilización de los suelos. Sin embargo, incorporar directamente los subproductos de vinificación al suelo, práctica tradicional y común como mencionamos en el apartado anterior, puede causar efectos adversos en los cultivos debido a las propiedades fitotóxicas y antimicrobiales con las que se relacionan a algunos polifenoles. Hay estudios en los que se afirma la necesidad de pretratar los

⁵⁹ Eynard, A. R. and Lopez, C. B., *Lipids Health Dis.*, 2003, **2**, 1-5.

⁶⁰ Kris-Etherton, P. M. *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 1999, **70**, 1009-1015.

⁶¹ Fiori, L. *et al.*, *J. Supercritical Fluids*, 2014, **94**, 71-80.

⁶² Lachman, J. *et al.*, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **49**, 445-453.

⁶³ Rubio, M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 2812-2815.

subproductos vitivinícolas con, por ejemplo, el compostaje, antes de incorporarlos al suelo para evitar esos efectos ⁶⁴. Por consiguiente, el compostaje de los subproductos vitivinícolas se presenta como una alternativa a su disposición tradicional.

El compostaje consiste en un tratamiento biológico mediante el cual se realiza una descomposición de la materia orgánica de manera controlada. Esta descomposición es realizada por microorganismos termófilos y mesófilos de forma aeróbica, que utilizan la materia orgánica como sustrato descomponiéndola en un producto final más estable y apropiado para el abono del suelo. El compostaje requiere remover la materia orgánica periódicamente controlando los parámetros de aireación y humedad, que resultan de extrema importancia para este procedimiento.

Son diversas las investigaciones que versan sobre la elaboración de compost a partir de subproductos vitivinícolas estudiándose formas de elaborarlo, composición físico-química, microbiológica o la influencia de microorganismos patógenos ^{65,66,67}. También son numerosos los estudios en los que se utilizan los subproductos vitivinícolas mezclados junto a otros residuos orgánicos para su compostaje ^{68,69,70,71}. Igualmente y de forma reciente, se ha estudiado la elaboración de vermicompost a partir de subproductos vitivinícolas

⁶⁴ Bustamante, M. A. et al., *Bioresour. Technol.*, 2007, **98**, 3269-3277.

⁶⁵ Bertran, E. et al., *Bioresour. Technol.*, 2004, **95**, 203-208.

⁶⁶ Bustamante, M. A. et al., *Bioresour. Technol.*, 2008, **99**, 7299-7306.

⁶⁷ Paradelo, R. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 3085-3092.

⁶⁸ Bustamante, M. A. et al., *Water Sci. Technol.*, 2007, **56**, 187-192.

⁶⁹ Bustamante, M. A. et al., *Chemosphere*, 2008, **72**, 551-557.

⁷⁰ Fernández, F. J. et al., *Waste Manage.*, 2010, **30**, 1948-1956.

⁷¹ Ferrer, J. et al., *Bioresour. Technol.*, 2001, **76**, 39-44.

obteniéndose resultados muy favorables con este tipo de compostaje^{72,73,74,75}.

El vermicompostaje consiste en un proceso bio-oxidativo en el que lombrices detritívoras, generalmente la lombriz roja de California o *Eisenia foetida*, actúan junto a microorganismos, en un proceso no termofílico, descomponiendo y estabilizando la materia orgánica, convirtiéndola en humus de lombriz o vermicompost.

5. Producción de biodiesel a partir de subproductos vitivinícolas.

El biodiesel surge como una alternativa a los combustibles fósiles. Este combustible es biodegradable, no tóxico y presenta un perfil de emisión de gases menor al de los combustibles derivados del petróleo. Se genera a partir de una reacción de transesterificación de los triglicéridos contenidos en aceites vegetales o grasas animales. Los triglicéridos se hacen reaccionar con un alcohol de cadena corta, normalmente metanol, generalmente en presencia de una base fuerte que hace de catalizador, para dar lugar a las correspondientes moléculas de glicerol o glicerina y a los alquil ésteres de los ácidos grasos.

Para la generación de biodiesel se pueden emplear distintos tipos de aceites vegetales. La utilización de aceites procedentes de residuos o subproductos agrícolas aparece como una oportunidad de revalorización de estas materias y de aprovechamiento de estos recursos naturales. A menudo, los aceites que se han investigado para la elaboración de biodiesel son aquellos que aparecen abundantemente en un área específica. Uno de ellos ha sido el aceite de pepita

⁷² Castillo, J. M. et al., *J. Hazard. Mater.*, 2014, **267**, 119-127.

⁷³ Domínguez, J. et al., *Waste Manage. Res.*, 2014, **32**, 1235-1240.

⁷⁴ Fernández-Bayo, J. D. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 5435-5442.

⁷⁵ Gómez-Brandón, M. et al., *J. Hazard. Mater.*, 2011, **187**, 291-295.

de uva⁷⁶. Hay estudios que muestran que a partir del aceite de pepita de uva puede obtenerse biodiesel de buena calidad⁷⁷.

6. Utilización de los subproductos vitivinícolas como adsorbentes.

Los efluentes residuales industriales pueden tener altos contenidos en metales pesados. Estos suponen una importante fuente de contaminación, ya que los metales pesados se caracterizan por no ser biodegradable y presentar una alta toxicidad, debido a que pueden acumularse en los tejidos vivos, causando desórdenes y enfermedades. En la búsqueda de métodos más económicos y respetuosos con el medio ambiente que permitan separar estos metales pesados de los efluentes acuosos industriales, aparece la biosorción como una alternativa⁷⁸. La biosorción consiste en la utilización de biomasa como adsorbentes. Ciertos residuos o subproductos de la industria agrícola han sido reconocidos como buenos adsorbentes de metales pesados. La capacidad adsorbente de los metales pesados por este tipo de material puede ser atribuida a su contenido en proteínas, carbohidratos o compuestos fenólicos, que poseen grupos carboxilo, hidroxilo, sulfato, fosfatos o aminos que pueden unirse a los metales.

Existen estudios en los que se ha investigado sobre la capacidad adsorbente de metales pesados de ciertos subproductos vitivinícolas. Se ha estudiado la capacidad de adsorción sobre el cadmio y plomo de los orujos^{79,80} y la de los

⁷⁶ Ramos, M. J. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2009, **100**, 261-268.

⁷⁷ Fernández, C. M. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2010, **101**, 7019-7024.

⁷⁸ Kratochvil, D. and Volesky, B., *Trends Biotechnol.*, 1998, **16**, 291-300.

⁷⁹ Farinella, N. V. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2007, **98**, 1940-1946.

⁸⁰ Farinella, N. V. *et al.*, *J. Hazard. Mater.*, 2008, **154**, 1007-1012

raspones sobre cobre, zinc y níquel^{81,82}, obteniéndose resultados muy favorables en todos los casos.

7. Uso de los subproductos vitivinícolas como sustratos para la obtención de diversos compuestos a partir de microorganismos.

El contenido en azúcares hemicelulósicos de los orujos y sarmientos de poda puede ser hidrolizado para producir soluciones que contienen monómeros de xilosa y glucosa, obteniéndose buenos y económicos medios de cultivo para ciertos microorganismos como el *Lactobacillus pentosus*, que permiten obtener ácido láctico, xilitol y bioemulsificadores^{83,84,85,86} entre otros, todos compuestos de interés industrial. Se ha estudiado también el uso de las lías de vinificación como medio de cultivo para distintos tipos de *Lactobacillus*, encontrándose que las lías pueden ser también un buen medio de cultivo para la obtención de ácido láctico⁸⁷.

Se ha investigado sobre el uso de extractos acuosos de orujo como medio de cultivo para bacterias productoras de celulosa extracelular como la *Gluconacetobacter* o *Agrobacterium*, obteniéndose también resultados favorables⁸⁸.

⁸¹ Villaescusa, I. et al., *Water Res.*, 2004, **38**, 992-1002.

⁸² Zouboulis, A. I. et al., *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 2002, **77**, 958-964.

⁸³ Bustos, G. et al., *J. Sci. Food Agric.*, 2005, **85**, 466-472.

⁸⁴ Devesa-Rey, R. et al., *Waste Manage.*, 2011, **31**, 2327-2335.

⁸⁵ Portilla-Rivera, O. M. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 10162-10168.

⁸⁶ Rivas, B. et al., *J. Sci. Food Agric.*, 2007, **87**, 1603-1612.

⁸⁷ Bustos, G. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 5233-5239.

⁸⁸ Carreira, P. et al., *Bioresour. Technol.*, 2011, **102**, 7354-7360.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

Varios autores han propuesto la utilización de los orujos de vinificación como medio de fermentación en estado sólido para la producción de enzimas hidrolíticas a través de *Aspergillus awamori*^{89,90}. Se ha concluido que los orujos pueden ser un buen medio de fermentación para la obtención de enzimas hidrolíticas como la celulasa, xilanasa y pectinasa, todas utilizadas por diversas industrias como la alimentaria o la química.

Todos los estudios mencionados no hacen más que evidenciar el gran interés que los residuos vitivinícolas están generando entre la comunidad científica y el gran potencial que parecen tener.

⁸⁹ Botella, C. *et al.*, *Biochem. Eng. J.*, 2005, **26**, 100-106.

⁹⁰ Díaz, A. B. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 840-846.

2.3. BIBLIOGRAFÍA.

- AACC report (2001). The definition of dietary fiber. *American Association of Cereal Chemists*, 46, 112–126.
- Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., & Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 65, 18-24.
- Alonso, Á. M., Guillén, D. A., Barroso, C. G., Puertas, B., & García, A. (2002). Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(21), 5832-5836.
- Arvanitoyannis, I. S., Ladas, D., & Mavromatis, A. (2006). Potential uses and applications of treated wine waste: A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 41(5), 475-487.
- Bertran, E., Sort, X., Soliva, M., & Trillas, I. (2004). Composting winery waste: Sludges and grape stalks. *Bioresource technology*, 95(2), 203-208.
- Botella, C., De Ory, I., Webb, C., Cantero, D., & Blandino, A. (2005). Hydrolytic enzyme production by *Aspergillus awamori* on grape pomace. *Biochemical engineering journal*, 26(2-3), 100-106.
- Briviba, K., Pan, L., & Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Nutrition*, 132(9), 2814-2818.
- Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Pérez-Espinosa, A., Moreno-Caselles, J., & Pérez-Murcia, M. D. (2008). Agrochemical characterisation of the solid by-products and residues from the winery and distillery industry. *Waste Management*, 28(2), 372-380.
- Bustamante, M. A., Moral, R., Paredes, C., Vargas-García, M. C., Suárez-Estrella, F., & Moreno, J. (2008). Evolution of the pathogen content during co-composting of winery and distillery wastes. *Bioresource technology*, 99(15), 7299-7306.
- Bustamante, M. A., Paredes, C., Marhuenda-Egea, F. C., Pérez-Espinosa, A., Bernal, M. P., & Moral, R. (2008). Co-composting of distillery wastes with animal manures: Carbon and nitrogen transformations in the evaluation of compost stability. *Chemosphere*, 72(4), 551-557.
- Bustamante, M. A., Paredes, C., Moral, R., Moreno-Caselles, J., Pérez-Murcia, M. D., Pérez-Espinosa, A., & Bernal, M. P. (2007). Co-composting of distillery and winery wastes with sewage sludge. *Water Science and Technology*, 56(2), 187-192.
- Bustamante, M. A., Pérez-Murcia, M. D., Paredes, C., Moral, R., Pérez-Espinosa, A., & Moreno-Caselles, J. (2007). Short-term carbon and nitrogen mineralisation in soil amended with winery and distillery organic wastes. *Bioresource technology*, 98(17), 3269-3277.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., & Domínguez, J. M. (2004). Evaluation of vinification lees as a general medium for *Lactobacillus* strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5233-5239.
- Bustos, G., Moldes, A. B., Cruz, J. M., & Domínguez, J. M. (2005). Production of lactic acid from vine-trimming wastes and viticulture lees using a simultaneous saccharification fermentation method. *Journal of the science of food and agriculture*, 85(3), 466-472.
- Camire, M. E., Chaovanalikit, A., Dougherty, M. P., & Briggs, J. (2002). Blueberry and grape anthocyanins as breakfast cereal colorants. *Journal of Food Science*, 67(1), 438-441.
- Carreira, P., Mendes, J. A. S., Trovatti, E., Serafim, L. S., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D., & Neto, C. P. (2011). Utilization of residues from agro-forest industries in the production of high value bacterial cellulose. *Bioresource technology*, 102(15), 7354-7360.
- Castillo, J. M., Nogales, R., & Romero, E. (2014). Biodegradation of 3,4 dichloroaniline by fungal isolated from the preconditioning phase of winery wastes subjected to vermicomposting. *Journal of hazardous materials*, 267, 119-127.
- Consejería de Agricultura, Pesca y Desarrollo Rural. Junta de Andalucía. URL: http://www.juntadeandalucia.es/agriculturaypesca/portal/servicios/noticias/_detalles.html?uid=d81f9aa5-900a-11e4-8a6d-1a4a0f000f45 [Consulta: septiembre de 2015].
- De Gaetano, G., Di Castelnuovo, A., & Rotondo, S. (2005). Cardiovascular protective effect of moderate wine consumption: Evidence after the French Paradox. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 17(1), 47-60.
- Deng, Q., Penner, M. H., & Zhao, Y. (2011). Chemical composition of dietary fiber and polyphenols of five different varieties of wine grape pomace skins. *Food Research International*, 44(9), 2712-2720.
- Devesa-Rey, R., Vecino, X., Varela-Alende, J. L., Barral, M. T., Cruz, J. M., & Moldes, A. B. (2011). Valorization of winery waste vs. the costs of not recycling. *Waste Management*, 31(11), 2327-2335.
- Díaz, A. B., Bolívar, J., de Ory, I., Caro, I., & Blandino, A. (2011). Applicability of enzymatic extracts obtained by solid state fermentation on grape pomace and orange peels mixtures in must clarification. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 840-846.
- Domínguez, J., Martínez-Cordeiro, H., Álvarez-Casas, M., & Lores, M. (2014). Vermicomposting grape marc yields high quality organic biofertiliser and bioactive polyphenols. *Waste Management and Research*, 32(12), 1235-1240.
- España. Ley 22/2011, de 28 de julio, de residuos y suelos contaminados. [Internet] *Boletín Oficial del Estado*, núm. 181, de 29 de Julio de 2011 [Consulta: septiembre de 2015]. Disponible en: <http://www.boe.es/buscar/act.php?id=BOE-A-2011-13046>

- España. Real Decreto 1244/2008, de 18 de julio, por el que se regula el potencial de producción vitícola. [Internet] *Boletín Oficial del Estado*, núm. 174, de 19 de julio de 2008, páginas 31652 a 31679 (28 págs) Disponible en: https://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=.) BOE-A-2008-12387 [Consulta: septiembre de 2015].
- Eynard, A. R., & Lopez, C. B. (2003). Conjugated linoleic acid (CLA) versus saturated fats/cholesterol: Their proportion in fatty and lean meats may affect the risk of developing colon cancer. *Lipids in Health and Disease*, 2, 1-5.
- Farinella, N. V., Matos, G. D., & Arruda, M. A. Z. (2007). Grape bagasse as a potential biosorbent of metals in effluent treatments. *Bioresource technology*, 98(10), 1940-1946.
- Farinella, N. V., Matos, G. D., Lehmann, E. L., & Arruda, M. A. Z. (2008). Grape bagasse as an alternative natural adsorbent of cadmium and lead for effluent treatment. *Journal of hazardous materials*, 154(1-3), 1007-1012.
- Fernández-Bayo, J. D., Nogales, R., & Romero, E. (2009). Effect of vermicomposts from wastes of the wine and alcohol industries in the persistence and distribution of Imidacloprid and diuron on agricultural soils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(12), 5435-5442.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 130(4), 797-813.
- Fernández, C. M., Ramos, M. J., Pérez, Á., & Rodríguez, J. F. (2010). Production of biodiesel from winery waste: Extraction, refining and transesterification of grape seed oil. *Bioresource technology*, 101(18), 7019-7024.
- Fernández, F. J., Sánchez-Arias, V., Rodríguez, L., & Villaseñor, J. (2010). Feasibility of composting combinations of sewage sludge, olive mill waste and winery waste in a rotary drum reactor. *Waste Management*, 30(10), 1948-1956.
- Ferrer, J., Páez, G., Mármol, Z., Ramones, E., Chandler, C., Marín, M., & Ferrer, A. (2001). Agronomic use of biotechnologically processed grape wastes. *Bioresource technology*, 76(1), 39-44.
- FEV. Federación Española del Vino. URL: <http://www.fev.es> [Consulta: septiembre de 2015]
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Sri Harsha, P. S. C., Mohamed, H. B., & Guella, G. (2014). Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *Journal of Supercritical Fluids*, 94, 71-80.
- García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., & García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563, 44-50.
- Gómez-Brandón, M., Lazcano, C., Lores, M., & Domínguez, J. (2011). Short-term stabilization of grape marc through earthworms. *Journal of hazardous materials*, 187(1-3), 291-295.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

- Hidalgo Togores, J. *Tratado de Enología*. 2ª Ed. Madrid-México: Ediciones Mundi-Prensa, 2011.
- Hoye, C., & Ross, C. F. (2011). Total Phenolic Content, Consumer Acceptance, and Instrumental Analysis of Bread Made with Grape Seed Flour. *Journal of Food Science*, 76(7), S428-S436.
- Ishida, K., Kishi, Y., Oishi, K., Hirooka, H., & Kumagai, H. (2015). Effects of feeding polyphenol-rich winery wastes on digestibility, nitrogen utilization, ruminal fermentation, antioxidant status and oxidative stress in wethers. *Animal Science Journal*, 86(3), 260-269.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., & Kinsella, J. E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 64-69.
- Kratochvil, D., & Volesky, B. (1998). Advances in the biosorption of heavy metals. *Trends in biotechnology*, 16(7), 291-300.
- Kris-Etherton, P. M., Pearson, T. A., Wan, Y., Hargrove, R. L., Moriarty, K., Fishell, V., & Etherton, T. D. (1999). High-monounsaturated fatty acid diets lower both plasma cholesterol and triacylglycerol concentrations. *American Journal of Clinical Nutrition*, 70(6), 1009-1015.
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Hejtmánková, K., Horníčková, T., Pivec, V., Skala, O., Dedina, M., & Pribyl, J. (2013). Towards complex utilisation of winemaking residues: Characterisation of grape seeds by total phenols, tocopherols and essential elements content as a by-product of winemaking. *Industrial Crops and Products*, 49, 445-453.
- Lafka, T., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206-1214.
- Larrea, A. *La poda de invierno en la vid*. Hojas Divulgadoras, Ministerio de Agricultura: Madrid, 1966. Disponible en URL: http://www.magrama.gob.es/ministerio/pags/biblioteca/hojas/hd_1966_05.pdf [Consulta: septiembre de 2015].
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., & Fiori, L. (2015). Screening grape seeds recovered from winemaking by-products as sources of reducing agents and mammalian α -glucosidase and α -amylase inhibitors. *International Journal of Food Science and Technology*, 50(5), 1182-1189.
- Lavelli, V., Sri Harsha, P. S. C., Torri, L., & Zeppa, G. (2014). Use of winemaking by-products as an ingredient for tomato puree: The effect of particle size on product quality. *Food Chemistry*, 152, 162-168.
- Llobera, A., & Cañellas, J. (2007). Dietary fibre content and antioxidant activity of Manto Negro red grape (*Vitis vinifera*): pomace and stem. *Food Chemistry*, 101(2), 659-666.
- Llobera, A., & Cañellas, J. (2008). Antioxidant activity and dietary fibre of Prensal Blanc white grape (*Vitis vinifera*) by-products. *International Journal of Food Science and Technology*, 43(11), 1953-1959.

- MAGRAMA. Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente. Gobierno de España. URL: <http://www.magrama.gob.es/es/agricultura/temas/producciones-agricolas/vitivinicultura/> [Consulta: septiembre de 2015]
- Malien-Aubert, C., Dangles, O., & Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 170-176.
- Max, B., Torrado, A. M., Moldes, A. B., Converti, A., & Domínguez, J. M. (2009). Ferulic acid and p-coumaric acid solubilization by alkaline hydrolysis of the solid residue obtained after acid prehydrolysis of vine shoot prunings: Effect of the hydroxide and pH. *Biochemical engineering journal*, 43(2), 129-134.
- Meyer, A. S., Heinonen, M., & Frankel, E. N. (1998). Antioxidant interactions of catechin, cyanidin, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. *Food Chemistry*, 61(1-2), 71-75.
- Mildner-Szkudlarz, S., Bajerska, J., Zawirska-Wojtasiak, R., & Górecka, D. (2013). White grape pomace as a source of dietary fibre and polyphenols and its effect on physical and nutraceutical characteristics of wheat biscuits. *Journal of the science of food and agriculture*, 93(2), 389-395.
- Mildner-Szkudlarz, S., Zawirska-Wojtasiak, R., Szwengiel, A., & Pacynski, M. (2011). Use of grape by-product as a source of dietary fibre and phenolic compounds in sourdough mixed rye bread. *International Journal of Food Science and Technology*, 46(7), 1485-1493.
- Moure, A., Cruz, J. M., Franco, D., Manuel Domínguez, J., Sineiro, J., Domínguez, H., Núñez, M. J., & Carlos Parajó, J. (2001). Natural antioxidants from residual sources. *Food Chemistry*, 72(2), 145-171.
- OeMv. Observatorio Español del Mercado del Vino. URL: <http://www.oemv.es/esp/consume-de-vino-en-hogares-132p.php> [Consulta: septiembre de 2015]
- OIV. Organización Internacional de la Viña y el Vino. URL: <http://www.oiv.int/oiv/info/espublicationsstatistiques> [Consulta: septiembre de 2015]
- Paradelo, R., Moldes, A. B., & Barral, M. T. (2010). Utilization of a factorial design to study the composting of hydrolyzed grape marc and vinification lees. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(5), 3085-3092.
- Pazos, M., Gallardo, J. M., Torres, J. L., & Medina, I. (2005). Activity of grape polyphenols as inhibitors of the oxidation of fish lipids and frozen fish muscle. *Food Chemistry*, 92(3), 547-557.
- Pérez-Jiménez, J., Serrano, J., Tabernero, M., Arranz, S., Díaz-Rubio, M. E., García-Diz, L., Goñi, I., & Saura-Calixto, F. (2008). Effects of grape antioxidant dietary fiber in cardiovascular disease risk factors. *Nutrition*, 24(7-8), 646-653.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

- Portilla-Rivera, O. M., Torrado, A. M., Domínguez, J. M., & Moldes, A. B. (2010). Stabilization of kerosene/water emulsions using bioemulsifiers obtained by fermentation of hemicellulosic sugars with lactobacillus pentosus. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(18), 10162-10168.
- Pozuelo, M. J., Agis-Torres, A., Hervert-Hernández, D., López-Oliva, M. E., Muñoz-Martínez, E., Rotger, R., & Goñi, I. (2012). Grape Antioxidant Dietary Fiber Stimulates Lactobacillus Growth in Rat Cecum. *Journal of Food Science*, 77(2), H59-H62.
- Ramos, M. J., Fernández, C. M., Casas, A., Rodríguez, L., & Pérez, A. (2009). Influence of fatty acid composition of raw materials on biodiesel properties. *Bioresource technology*, 100(1), 261-268.
- Real Academia Española. *Diccionario de la lengua española*. 22ª Ed. Madrid: Espasa, 2001.
- Ribeiro, B., Cardoso, C., Silva, H. A., Serrano, C., Ramos, C., Santos, P. C., & Mendes, R. (2013). Effect of grape dietary fibre on the storage stability of innovative functional seafood products made from farmed meagre (*Argyrosomus regius*). *International Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 10-21.
- Rivas, B., Torrado, A., Rivas, S., Moldes, A. B., & Domínguez, J. M. (2007). Simultaneous lactic acid and xylitol production from vine trimming wastes. *Journal of the science of food and agriculture*, 87(8), 1603-1612.
- Rosales Soto, M. U., Brown, K., & Ross, C. F. (2012). Antioxidant activity and consumer acceptance of grape seed flour-containing food products. *International Journal of Food Science and Technology*, 47(3), 592-602.
- Rubio, M., Alvarez-Ortí, M., Andrés Alvarruiz, Fernández, E., & Pardo, J. E. (2009). Characterization of oil obtained from grape seeds collected during berry development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(7), 2812-2815.
- Ruggieri, L., Cadena, E., Martínez-Blanco, J., Gasol, C. M., Rieradevall, J., Gabarrell, X., Gea, T., Sort, X., & Sánchez, A. (2009). Recovery of organic wastes in the Spanish wine industry. Technical, economic and environmental analyses of the composting process. *Journal of Cleaner Production*, 17(9), 830-838.
- Ruiz-Moreno, M. J., Raposo, R., Cayuela, J. M., Zafrilla, P., Piñeiro, Z., Moreno-Rojas, J. M., Mulero, J., Puertas, B., Giron, F., Guerrero, R. F., & Cantos-Villar, E. (2015). Valorization of grape stems. *Industrial Crops and Products*, 63, 152-157.
- Sáyago-Ayerdi, S. G., Brenes, A., & Goñi, I. (2009). Effect of grape antioxidant dietary fiber on the lipid oxidation of raw and cooked chicken hamburgers. *LWT - Food Science and Technology*, 42(5), 971-976.
- Sharma, A. K., Kumar, R., Azad, Z. R. A. A., & Adsule, P. G. (2013). Use of fine wine lees for value addition in ice cream. *Journal of Food Science and Technology*, 1-5.

- Shrikhande, A. J. (2000). Wine by-products with health benefits. *Food Research International*, 33(6), 469-474.
- Sri Harsha, P. S. C., Gardana, C., Simonetti, P., Spigno, G., & Lavelli, V. (2013). Characterization of phenolics, in vitro reducing capacity and anti-glycation activity of red grape skins recovered from winemaking by-products. *Bioresource technology*, 140, 263-268.
- Tseng, A., & Zhao, Y. (2013). Wine grape pomace as antioxidant dietary fibre for enhancing nutritional value and improving storability of yogurt and salad dressing. *Food Chemistry*, 138(1), 356-365.
- Unión Europea. Directiva 2008/98/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, de 19 de noviembre de 2008, sobre los residuos y por la que se derogan determinadas Directivas. [Internet] *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 312, de 22 de noviembre de 2008, páginas 3 a 30 (28 págs.) [Consulta: septiembre de 2015] Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-82319>
- Unión Europea. Reglamento (CE) nº 479/2008 del Consejo, de 29 de abril de 2008, por el que se establece la organización común del mercado vitivinícola. [Internet] *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 148, de 6 de junio de 2008, páginas 1 a 61 (61 págs.). Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2008-81028> [Consulta: septiembre de 2015].
- Vatai, T., Škerget, M., Knez, Z., Kareth, S., Wehowski, M., & Weidner, E. (2008). Extraction and formulation of anthocyanin-concentrates from grape residues. *Journal of Supercritical Fluids*, 45(1), 32-36.
- Villaescusa, I., Fiol, N., Martínez, M., Miralles, N., Poch, J., & Serarols, J. (2004). Removal of copper and nickel ions from aqueous solutions by grape stalks wastes. *Water research*, 38(4), 992-1002.
- Xu, C., Yagiz, Y., Marshall, S., Li, Z., Simonne, A., Lu, J., & Marshall, M. R. (2015). Application of muscadine grape (*Vitis rotundifolia* Michx.) pomace extract to reduce carcinogenic acrylamide. *Food Chemistry*, 182, 200-208.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.
- Yu, J., & Ahmedna, M. (2013). Functional components of grape pomace: Their composition, biological properties and potential applications. *International Journal of Food Science and Technology*, 48(2), 221-237.
- Zhu, F., Cai, Y. Z., Ke, J., & Corke, H. (2009). Evaluation of the effect of plant extracts and phenolic compounds on reduction of acrylamide in an asparagine/glucose model system by RP-HPLC-DAD. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(10), 1674-1681.

2. Fundamentos teóricos y antecedentes

- Zhu, F., Du, B., Zheng, L., & Li, J. (2015). Advance on the bioactivity and potential applications of dietary fibre from grape pomace. *Food Chemistry*, 186, 207-212.
- Zouboulis, A. I., Lazaridis, N. K., & Matis, K. A. (2002). Removal of toxic metal ions from aqueous systems by biosorptive flotation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(8), 958-964.
- Zouboulis, A. I., Lazaridis, N. K., & Matis, K. A. (2002). Removal of toxic metal ions from aqueous systems by biosorptive flotation. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77(8), 958-964.

CAPÍTULO 3. MUESTRAS Y PARÁMETROS

OBJETO DE ESTUDIO.

3.1. MUESTRAS ESTUDIADAS.

En el presente trabajo se han caracterizado dos tipos de subproductos vitivinícolas procedentes de la industria enológica andaluza: orujos y uvas de aclareo, de cinco variedades distintas de uvas tintas. Las variedades elegidas fueron: cabernet sauvignon, syrah y tempranillo por ser de las variedades tintas más abundantes en Andalucía. La variedad petit verdot, porque si bien no es de las más abundantes, su cultivo está creciendo recientemente, considerándose una variedad de gran potencial. Y finalmente, la variedad tintilla de Rota, por ser una variedad autóctona andaluza y gaditana, cada vez más utilizada en nuestro entorno.

Las muestra de orujos de las cinco variedades mencionadas, se analizaron durante tres vendimias consecutivas, correspondientes a los años 2012, 2013 y 2014, para así tener en cuenta la variabilidad que se puede dar entre distintas vendimias. De esta manera se han podido obtener datos de tres campañas consecutivas, pudiéndose establecer datos medios y rangos de variabilidad.

Para el caso de la uva de aclareo, se realizó el estudio, de las mismas cinco variedades comentadas, durante la vendimia 2012 y se volvieron a analizar algunas de esas variedades, concretamente la tempranillo, cabernet sauvignon y syrah durante la campaña siguiente de 2013. Problemas logísticos impidieron que se pudiera repetir la experiencia en la vendimia siguiente. Además de los subproductos, se analizaron las uvas de las mismas variedades en el momento de vendimia a fin de utilizar los resultados como referencia.

Todas las muestras estudiadas, uvas de aclareo y orujos, proceden de la provincia de Cádiz, de la zona norte de la provincia, colindando con la provincia de Sevilla.

3. Muestras y parámetros objeto de estudio

- Las uvas de aclareo fueron recolectadas por nuestro grupo de investigación *in situ*, en estados de maduración próximos al envero. Muchos autores coinciden en que la época más efectiva para hacer el aclareo es el envero, ya que en este momento se alcanza la parada vegetativa y los ápices de los pámpanos no son activos, por tanto los azúcares sintetizados por las hojas se acumulan sólo en los racimos¹.
- Los orujos provienen de vinificaciones realizadas en el Centro Andaluz de Investigaciones Vitivinícolas, de forma que uvas y orujos fueron controlados en todo momento. Los orujos proceden de vinificaciones monovarietales, realizadas de acuerdo a condiciones usualmente empleadas en las vinificaciones de tintos andaluces. Las uvas fueron molturadas a 15º C, se les añadió 30 mg / l de sulfuroso y se les corrigió el pH con ácido tartárico hasta 3,6. Fermentaron a una temperatura media de 25º C y tras 10 días de encube se realizó un prensado suave a modo de sangrado.

A parte de la caracterización de los extractos hidrofílicos obtenidos de estos subproductos mencionados, se realizó un estudio del extracto oleico de los orujos. En este estudio, se incluyeron algunas variedades blancas como la palomino, pedro ximénez y moscatel. La falta de información relativa al contenido en tocoferoles y ácidos grasos de los orujos completos, que no de las pepitas, y el desconocimiento de si existen diferencias entre variedades tintas y blancas para estos parámetros en orujos, nos hizo incluir estas variedades para realizar una comparativa y estudiar la posible influencia del factor varietal.

¹ Puertas, B. *et al.*, *Libro de Actas del X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, 2003.

3.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS Y EXTRACCIONES.

Las uvas de aclareo fueron despalladas a mano. Ambos tipos de muestras, uvas de aclareo y orujos, fueron trituradas mediante la utilización de un robot de cocina y extraídas el mismo días de su correspondiente recolección.

- **Obtención de los extractos acuosos.**

En la literatura científica podemos encontrar muchos artículos relacionados con el estudio y desarrollo de métodos de extracción de subproductos de vinificación, fundamentalmente enfocados a la extracción de compuestos polifenólicos^{2,3,4,5}. Se ha estudiado la extracción a partir de diversas técnicas: extracción sólido-líquido⁵, ultrasonido^{6,7}, fluidos presurizados^{8,9}, microondas¹⁰, etc. También se han desarrollado estudios sobre la influencia del disolvente utilizado^{11,12,13,14}, tiempo de extracción¹⁵ o temperatura del proceso¹⁶.

² Casazza, A. A. *et al.*, *J. Food Eng.*, 2010, **100**, 50-55.

³ Delgado-Torre, M. P. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 3051-3060.

⁴ Drosou, C. *et al.*, *Ind. Crops Prod.*, 2015, article in press.

⁵ Fontana, A. R. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 8987-9003.

⁶ Cárcel, J. A. *et al.*, *Physics Procedia*, 2010, **3**, 147-152.

⁷ Ghafoor, K. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 4988-4994.

⁸ Aliakbarian, B. *et al.*, *Journal of Supercritical Fluids*, 2012, **65**, 18-24.

⁹ García-Marino, M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2006, **563**, 44-50.

¹⁰ Li, Y. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **129**, 570-576.

¹¹ Cheng, V. J. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **134**, 474-482.

¹² Louli, V. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2004, **92**, 201-208.

¹³ Makris, D. P. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2007, **98**, 2963-2967.

¹⁴ Yilmaz, Y. and Toledo, R. T., *J. Food Compos. Anal.*, 2006, **19**, 41-48.

¹⁵ T. Lafka, V. Sinanoglou and E. S. Lazos, *Food Chem.*, 2007, **104**, 1206-1214.

¹⁶ Kim, S. *et al.*, *Food Chem.*, 2006, **97**, 472-479.

3. Muestras y parámetros objeto de estudio

En el presente trabajo, la metodología elegida para la realización de las extracciones acuosas fue la propuesta por Carrera et al., 2012¹⁷. Dicha metodología propone la extracción de los compuestos polifenólicos presentes en la uva a partir de una extracción asistida mediante ultrasonidos, utilizando como solvente una mezcla etanol / agua (1:1). Este procedimiento consigue disminuir los tiempos de extracción a sólo 6 minutos, obteniéndose recuperaciones iguales o incluso mayores a las de otras técnicas de forma reproducible. De acuerdo a este procedimiento se pesó 1 gramo de cada muestra y se realizaron las correspondientes extracciones en 10 ml de una solución EtOH - H₂O (1:1), utilizando una sonda de ultrasonido, UP200S (Hielscher Ultrasonics, Teltow, Germany). Las muestras fueron centrifugadas en frío (5°C) durante 10 minutos y el sobrenadante trasvasado a un matraz. Tras varios lavados del sólido se procedió al enrase del matraz hasta un volumen final de 25 ml. Todas las extracciones fueron hechas por duplicado. Tras la realización de la extracción, las muestras fueron almacenadas a -20° C hasta su posterior análisis.

- **Extracción de los aceites.**

Para el estudio dedicado a la caracterización del contenido lipofílico de los orujos (*Capítulo 9*), en primer lugar, se realizó una deshidratación de dichos subproductos. La deshidratación consistió en un secado de los subproductos mediante la utilización de una cámara climática, en condiciones de 40° C de temperatura, 10% de humedad relativa y oscuridad, hasta que la pérdida de peso fue constante. Tras el secado, las muestras se molturaron y tamizaron para adquirir un tamaño de partícula homogéneo de entre 100 – 300 micra.

La extracción de los aceites se realizó utilizando un sistema soxhlet con n-hexano. Aunque la extracción de aceite de pepita a nivel industrial también se realice

¹⁷ Carrera, C. et al., *Anal. Chim. Acta*, 2012, **732**, 100–104.

mediante presión mecánica, los bajos rendimiento obtenidos de este procedimiento hacen que la extracción con n-hexano sea la metodología más usual¹⁸. En nuestro caso, se pesaron 10 g de muestra y se extrajeron durante 18 horas. Todas las extracciones se realizaron por duplicado.

Terminadas las extracciones, las muestras se llevaron a sequedad mediante un rotavapor a temperatura no superior a 40° C hasta peso constante, se pusieron bajo atmósfera inerte con nitrógeno y se congelaron a -20° C hasta su análisis.

3.3. PARÁMETROS CARACTERIZADOS.

El estudio realizado a los subproductos mencionados consistió, por un lado, en una caracterización de su extracto hidrofílico y, por otro, se realizó un estudio del extracto lipofílico de los orujos comparando los resultados con los aceites de pepitas de uvas.

Los parámetros seleccionados para la caracterización de los subproductos vitivinícolas andaluces objeto de estudio, fueron aquellos que, según la bibliografía precedente, pueden resultar de mayor interés desde un punto de vista industrial; considerándose, a posteriori, su aplicabilidad en cosmética. De esta manera, los parámetros determinados en los extractos acuosos fueron:

- a) En el extracto acuoso se hizo un exhaustivo estudio de su contenido polifenólico, determinándose:

¹⁸ Fiori, L. *et al.*, *J. Supercritical Fluids*, 2014, **94**, 71-80.

3. Muestras y parámetros objeto de estudio

1. Medidas generales del contenido en polifenoles totales, antocianos totales y taninos totales.
 2. Determinación de fenoles sencillos: ácidos benzoicos y cinámicos.
 3. Determinación de flavanoles.
 4. Determinación de flavonoles.
 5. Determinación de antocianos.
-
- b) Se realizó un estudio de su contenido en ácidos orgánicos.
 - c) Se analizó su contenido en aminoácidos.
 - d) Estimación de su actividad antioxidante.

La caracterización de los extractos oleicos se basó en el estudio de dos parámetros fundamentales:

- a) Su contenido en ácidos grasos.
- b) Su contenido en tocoferoles.

Para finalizar, se hizo un estudio de la viabilidad de la utilización de una cámara climática para el secado de los orujos como método para la conservación de dicho subproducto.

3.4. BIBLIOGRAFÍA.

- Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., & Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 65, 18-24.
- Cárcel, J. A., García-Pérez, J. V., Mulet, A., Rodríguez, L., & Riera, E. (2010). Ultrasonically assisted antioxidant extraction from grape stalks and olive leaves. In (pp. 147-152).
- Carrera, C., Ruiz-Rodríguez, A., Palma, M., & Barroso, C. G. (2012). Ultrasound assisted extraction of phenolic compounds from grapes. *Analytica Chimica Acta*, 732, 100-104.
- Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G., & Perego, P. (2010). Extraction of phenolics from *Vitis vinifera* wastes using non-conventional techniques. *Journal of Food Engineering*, 100(1), 50-55.
- Cheng, V. J., Bekhit, A., McConnell, M., Mros, S., & Zhao, J. (2012). Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chemistry*, 134(1), 474-482.
- Delgado-Torre, M. P., Ferreira-Vera, C., Priego-Capote, F., Pérez-Juan, P. M., & Luque De Castro, M. D. (2012). Comparison of accelerated methods for the extraction of phenolic compounds from different vine-shoot cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(12), 3051-3060.
- Drosou, C., Kyriakopoulou, K., Bimpilas, A., Tsimogiannis, D., & Krokida, M. (2015). A comparative study on different extraction techniques to recover red grape pomace polyphenols from vinification byproducts. *Industrial Crops and Products*. Article in press.
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Sri Harsha, P. S. C., Mohamed, H. B., & Guella, G. (2014). Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *Journal of Supercritical Fluids*, 94, 71-80.
- Fontana, A. R., Antonioli, A., & Bottini, R. (2013). Grape pomace as a sustainable source of bioactive compounds: Extraction, characterization, and biotechnological applications of phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(38), 8987-9003.
- García-Marino, M., Rivas-Gonzalo, J. C., Ibáñez, E., & García-Moreno, C. (2006). Recovery of catechins and proanthocyanidins from winery by-products using subcritical water extraction. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 44-50.
- Ghafoor, K., Choi, Y. H., Jeon, J. Y., & Jo, I. H. (2009). Optimization of ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from grape (*Vitis vinifera*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(11), 4988-4994.
- Gómez, M. E., Igartuburu, J. M., Pando, E., Rodríguez Luis, F., & Mourente, G. (2004). Lipid composition of lees from Sherry wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4791-4794.

3. Muestras y parámetros objeto de estudio

- Kim, S., Jeong, S., Park, W., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 472-479.
- Lafka, T., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206-1214.
- Li, Y., Skouroumounis, G. K., Elsey, G. M., & Taylor, D. K. (2011). Microwave-assistance provides very rapid and efficient extraction of grape seed polyphenols. *Food Chemistry*, 129(2), 570-576.
- Louli, V., Ragoussis, N., & Magoulas, K. (2004). Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. *Bioresource technology*, 92(2), 201-208.
- Makris, D. P., Boskou, G., & Andrikopoulos, N. K. (2007). Recovery of antioxidant phenolics from white vinification solid by-products employing water/ethanol mixtures. *Bioresource technology*, 98(15), 2963-2967.
- Mori, K., Sugaya, S., & Gemma, H. (2005). Decreased anthocyanin biosynthesis in grape berries grown under elevated night temperature condition. *Scientia Horticulturae*, 105(3), 319-330.
- Puertas, B.; Cruz, S.; Serrano, M.J.; Valcárcel, M.C.; García de Luján, A. "Incidencia de la práctica del aclareo de racimos en la concentración de antocianos y taninos y en el color de los vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Tempranillo". *Libro de Actas del X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, 2003.
- Yilmaz, Y., & Toledo, R. T. (2006). Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19(1), 41-48.

CAPÍTULO 4. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO POLIFENÓLICO.

4.1. INTRODUCCIÓN.

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un grupo heterogéneo de sustancias que surgen como metabolitos secundarios de origen vegetal. Algunos de estos compuestos son indispensables para las funciones fisiológicas vegetales mientras que otros participan en funciones de defensa ante situaciones de estrés y estímulos diversos (hídrico, luminoso, etc)¹.

Se caracterizan por tener uno o varios anillos aromáticos que contiene al menos un grupo hidroxilo. Sus estructuras van desde moléculas sencillas, como los ácidos fenólicos, a estructuras poliméricas complejas, como es el caso de los taninos. Desde un punto de vista enológico, estos compuestos juegan un papel muy importante en las características sensoriales del producto final, interviniendo en propiedades como el color, aroma, amargor o astringencia. También intervienen en reacciones de oxidación, en interacciones con proteínas y en los procesos de envejecimiento y crianza de los vinos².

Generalmente los compuestos polifenólicos se clasifican en compuestos flavonoides y no flavonoides.

❖ Compuestos fenólicos no flavonoides.

Los fenoles no flavonoides son compuestos fenólicos sencillos. Dentro de este grupo podemos encontrar dos subfamilias, los ácidos fenólicos, que se dividen a su vez en ácidos benzoicos (C6-C1) y ácidos cinámicos (C6-C3), y los estilbenos (C6-C2-C6).

¹ Quiñones, M. *et al.*, *Nutr. Hosp.*, 2012, **27**, 76-89.

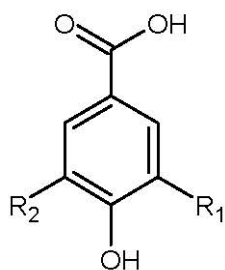
² Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*, 1ª ed., 2010.

- **Ácidos fenólicos.**

Se localizan en la pulpa y el hollejo de la uva. Son incoloros en disoluciones hidroalcohólicas. Aparecen con frecuencia enlazados a otras moléculas formando derivados glicosilados o ésteres de ácido quínico, shikímico o tartárico³.

Ácidos benzoicos.

Los ácidos benzoicos poseen una estructura C6-C1. Son derivados de ácidos hidroxibenzoicos que se diferencian en función de los sustituyentes del anillo aromático. Los ácidos benzoicos más abundantes en uva y vino son el ácido gálico, p-hidroxibenzoico, protocatéquico, sirínico y vainílico⁴.



Estructura Ácido Benzoico

ÁCIDOS BENZOICOS	R1	R2
Ácido gálico	OH	OH
Ácido p-hidroxibenzoico	H	H
Ácido protocatéquico	OH	H
Ácido sirínico	OCH ₃	OCH ₃
Ácido vainílico	H	OCH ₃

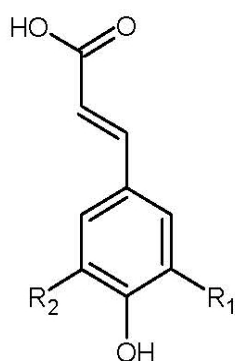
Ácidos cinámicos.

Presentan una estructura C6–C3. Debido al doble enlace de su estructura aparecen formas isoméricas cis y trans, siendo la forma trans la más

³ El Gharas, H., *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **44**, 2512-2518.

⁴ Garrido, J. and Borges, F., *Food Res. Int.*, 2013, **54**, 1844-1858.

abundante en la naturaleza. Se pueden encontrar formando ésteres con ácido quínico o glucosa, sin embargo, en las uvas y vinos aparecen fundamentalmente formando ésteres o diésteres con el ácido tartárico⁵. Los ácidos cinámicos se relacionan con los procesos de pardeamiento de los vinos blancos y son precursores de compuestos fenólicos volátiles⁶. En los vinos blancos son la principal clase de compuesto fenólico y la principal clase de no flavonoide en los tintos⁷. Los ácidos cinámicos más habituales en uvas y vinos son el ácido cafeico, ferúlico p-cumárico y sinápico.



Estructura Ácido Cinámico

ÁCIDOS CINÁMICOS	R1	R2
Ácido cafeico	OH	H
Ácido ferúlico	OCH ₃	H
Ácido p-cumárico	H	H
Ácido sinápico	OCH ₃	OCH ₃

- **Estilbenos.**

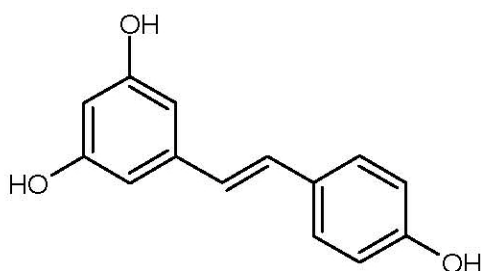
Los estilbenos son compuestos con estructuras C6-C2-C6, estando formados por dos anillos aromáticos unidos a través de una molécula de etileno. El estilbeno más referenciado en uvas y vinos es el trans-resveratrol. El resveratrol se localiza fundamentalmente en el hollejo de la uva y es sintetizado como una respuesta de protección de la vid ante ataques fúngicos o situaciones de estrés.

⁵ Buiarelli, F. *et al.*, *Food Chem.*, 2010, **123**, 827-833.

⁶ Kallithraka, S. *et al.*, *Food Chem.*, 2009, **113**, 500-505.

⁷ Vanzo, A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 1604-161.

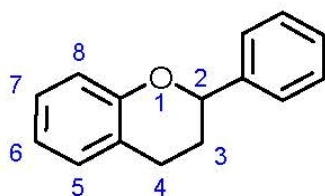
4. Caracterización del contenido polifenólico



Estructura del trans-resveratrol.

❖ Compuestos fenólicos flavonoides.

Los flavonoides poseen una estructura de 15 átomos de carbono que comprende dos anillos aromáticos unidos por un heterociclo oxigenado de tres átomos de carbono, presentando, por tanto, una estructura C6-C3-C6. Se puede realizar una clasificación, dentro de esta familia de compuestos, atendiendo al grado de oxidación del anillo pirano central. Las flavonas, flavononas, flavonoles y flavononoles tienen como heterociclo una pirona, los flavanoles un pirano y las antocianidinas un heterociclo pirilo. Los flavanoles se dividen a su vez en flavan-3-oles y en taninos condensados (procianidinas y prodelfinidinas).



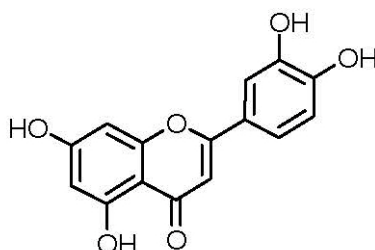
Estructura flavonoide

HETEROCICLO	ESTRUCTURA	FLAVONOIDE
Pirona		Flavonas Flavonoles Flavononas Flavononoles
Pirano		Flavanoles
Pirilo		Antocianidinas

En la naturaleza los flavonoides pueden encontrarse libres o esterificados con una o dos moléculas de azúcares a través de al menos un grupo hidroxilo. Aunque la glicosilación puede ocurrir a partir de cualquier grupo hidroxilo del flavonoide, es usual que se de en el carbono en posición 7 en flavonas y flavanonas, en el C₃ y C₇ de flavonoles y flavonoles o en el C₃ y C₅ en antocianidinas⁸.

- **Flavonas.**

Las flavonas presentan un doble enlace entre los C₂ y C₃ y no tienen un grupo hidroxilo en el C₃. Aunque las flavonas e isoflavonas (isómeros de las flavonas con el anillo aromático en el C₃) son muy habituales en el reino vegetal, en la uva no están presentes en cantidades significativas, a excepción de la luteolina⁹.



Estructura luteolina

- **Flavanonas.**

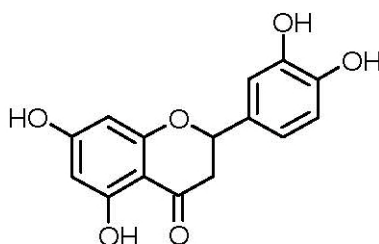
Las flavanonas son análogas a las flavonas pero con el enlace entre los C₂ y C₃ saturado. Constituyen un grupo minoritario en los alimentos. En la uva se ha podido encontrar eriodictiol¹⁰.

⁸ Jing, P. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2008, **56**, 9391-9398.

⁹ Fang, F. et al., *Food Res. Int.*, 2008, **41**, 53-60.

¹⁰ Garrido, J. and Borges, F., *Food Res. Int.*, 2013, **54**, 1844-1858.

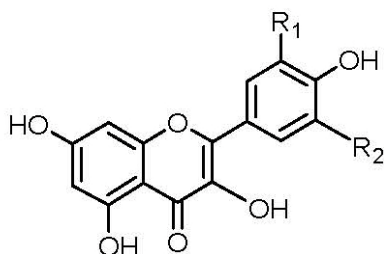
4. Caracterización del contenido polifenólico



Estructura eriodictiol

- **Flavonoles.**

Los flavonoles se caracterizan por la presencia de un doble enlace entre los C₂ y C₃, y un grupo hidroxilo en el C₃. Más del 90% de los flavonoles se encuentra hidroxilados en los C₃, C₅ y C₇¹¹. Los flavonoles pueden aparecer unidos a distintos azúcares, siendo las formas glucosiladas las más abundantes, si bien pueden aparecer también como glucurónidos, galatósidos y diglicósidos (glucosilarabinósido, glucosilgalactósido, glucosilxilósido y glucosilramnósido)¹². Son pigmentos de color amarillo que se localizan en los tejidos externos y aéreos de las plantas, ya que su biosíntesis es un proceso fotosintético. En el caso de la uva se encuentran principalmente en el hollejo. Los flavonoles más abundantes en uvas y vinos son: kaempferol, quercetina, miricetina e isoramnetina.



Estructura Flavonoles

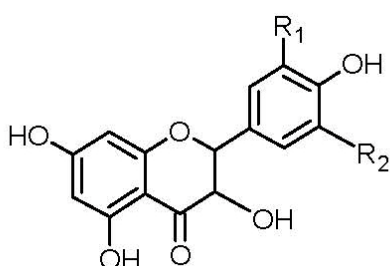
FLAVONOLES	R1	R2
Kaempferol	H	H
Quercetina	OH	H
Miricetina	OH	OH
Isoramnetia	OCH ₃	H

¹¹ Castillo-Muñoz, N. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 992-1002.

¹² Jeffery, D. W. *et al.*, *Austr. J. Grape Wine Res.*, 2008, **14**, 153-161.

- **Flavononoles.**

Se diferencian estructuralmente de los flavonoles por la ausencia del doble enlace del heterociclo. Son pigmentos de color amarillo que se han identificado en el hollejo de la uva blanca. Se encuentran normalmente glicosilados en el C₃. Los más abundantes son la astilbina y la engeletina¹³.



FLAVONONOLES	R1	R2
Engeletina (dihidrokaempferol)	H	H
Astilbina (dihidroquercetina)	OH	H

Estructura flavononoles

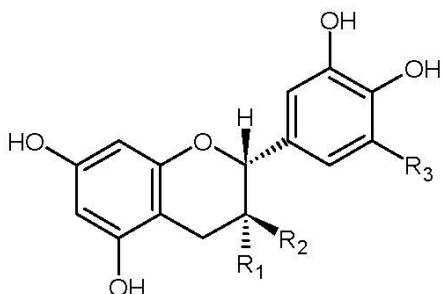
- **Flavanoles.**

Los flavanoles tienen un heterociclo pirano, por tanto no presentan un grupo carbonilo en el C₄. El enlace entre el C₂ y C₃ está saturado y poseen un grupo hidroxilo en el C₃. Este grupo hidroxilo puede aparecer esterificado con una molécula de ácido gálico. En la naturaleza, pueden encontrarse flavan-3-oles y flavan-3,4-dioles, si bien los últimos son poco frecuentes en frutos. Los flavan-3-oles más abundantes en la naturaleza, incluidos en la uva y el vino, son la catequina y su enantiómero, la epicatequina. Las catequinas se localizan en la piel y la semilla de la uva. Se han identificado

¹³ Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*, 1ª ed., 2010.

4. Caracterización del contenido polifenólico

distintos derivados de la catequina en uvas y vinos: galocatequina, epigalocatequina, epicatequina galato, epigalocatequina galato¹⁴.



Estructura flavanol

FLAVANOLES	R1	R2	R3
Catequina	H	OH	H
Epicatequina	OH	H	H
Galocatequina	H	OH	OH
Epigalocatequina	OH	H	OH

Los flavanoles tienden a formar oligómeros y polímeros dando lugar a lo que se conoce como taninos condensados, también llamados proantocianidinas o procianidinas, ya que su hidrólisis en medio ácido genera moléculas de cianidina. Si el polímero contiene galocatequinas o epigalocatequinas serían prodelfidinas, ya que de su hidrólisis ácida se obtiene delfidina, aunque de forma general se suele hablar de procianidinas para hacer referencia a los taninos condensados. Las procianidinas pueden reaccionar con proteínas y polisacáridos, participando de procesos de precipitación e inhibición enzimática¹⁵. Ejercen un importante rol en el proceso de crianza de los vinos debido a sus capacidades de oxidación, condensación y polimerización¹⁶. Son responsables del sabor amargo, de la astringencia y aportan coloración amarilla. Se localizan en las partes sólidas de la uva (piel, semilla y raspón). La cantidad, estructura y grado de polimerización depende de su localización en la uva. Los taninos de la semilla son oligómeros y polímeros de catequina, epicatequina y epicatequina galato mientras que en los

¹⁴ Decendit, A. *et al.*, *Phytochemistry*, 2002, **60**, 795-798.

¹⁵ De Freitas, V. and Mateus, N., *J. Agric. Food Chem.*, 2001, **49**, 940-945.

¹⁶ Escribano-Bailón, T. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1992, **40**, 1794-1799.

taninos del hollejo también se puede encontrar epigallocatequina, galocatequina y epigallocatequina galato. Las pepitas contienen una mayor concentración de taninos y los taninos del hollejo muestran un mayor grado de polimerización¹⁷. Las procianidinas poseen un amplio rango estructural y pesos moleculares muy variables, de forma que resulta una tarea bastante compleja determinar su contenido¹⁸.

Además de los taninos condensados que acabamos de describir, existen otra serie de taninos en los vinos llamados taninos hidrolizables o elágicos. Mientras que los taninos condensados o procianidinas provienen de la uva, los taninos hidrolizables provienen de la madera de la barrica y son extraídos durante el proceso de crianza o envejecimiento del vino.

- **Antocianidinas.**

La estructura de las antocianidinas se basa en el catión flavilio ó 2-fenil-benzopirilio. Las antocianidinas se encuentran usualmente en la naturaleza en forma glicosilada, generalmente a partir del C₃. La forma glicosilada se conoce con el nombre de antocianina. Se suele utilizar el término genérico antociano para aludir a ambas formas. En *Vitis Vinifera* sólo se identifican antocianinas monoglucósidas en posición 3, pudiendo la glucosa estar esterificada en posición 6 con los ácidos cafeico, p-cumárico y acético¹⁹. Los antocianos son los responsables de la coloración roja-azulada de la uva tinta y del vino, característica que viene determinada por su estructura

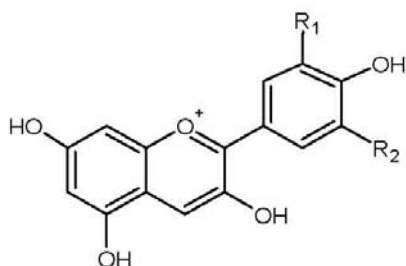
¹⁷ Monagas, M. et al., *Anal. Chim. Acta*, 2006, **563**, 401-410.

¹⁸ Rasmussen, S. E. et al., *Mol. Nutr. Food Res.*, 2005, **49**, 159-174.

¹⁹ Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*, 1ª ed., 2010.

4. Caracterización del contenido polifenólico

química, es decir, su grado de hidroxilación, metilación y glucosilación²⁰. Las distintas tonalidades de las uvas tintas vendrán dada por su composición cualitativa y cuantitativa en antocianinas. Se han identificado en uvas seis antocianos: cianidina (coloración rojo-anaranjada), pelargonidina (naranja), peonidina (roja), delphinidina, malvidina y petunidina (rojo-azulada)²¹. Las antocianinas se localizan en el hollejo de la uva. Son relativamente inestables y sensibles a diversos factores como el pH, la temperatura y la radiación ultravioleta²². Los datos sobre la distribución de las antocianinas en el hollejo de uva muestran que es la malvidin-3-O-glucósido la antocianina de mayor concentración, seguida por la peonidin-3-O-glucósido^{23,24}.



Estructura antocianidina

ÁNTOCIANIDINAS	R1	R2
Cianidina	OH	H
Peonidina	OCH ₃	H
Delfinidina	OH	OH
Petunidina	OCH ₃	OH
Malvidina	OCH ₃	OCH ₃

²⁰ He, F. *et al.*, *Molecules*, 2010, **15**, 9057-9091.

²¹ Koponen, J. M. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2007, **55**, 1612-1619.

²² De Pascual-Teresa, S. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2010, **11**, 1679-1703.

²³ Amico, V. *et al.*, *Bioresour. Technol.*, 2008, **99**, 5960-5966.

²⁴ Castillo-Muñoz, N. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 11105-11111.

4.2. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO POLIFENÓLICO TOTAL, ANTOCIANOS TOTALES Y TANINOS TOTALES.

4.2.1. Materiales y métodos.

4.2.1.1. Reactivos y disolventes.

Se utilizó HCl, metilcelulosa y sulfato de amonio suministrados por Panreac (Barcelona, España). Los patrones de ácido gálico, malvidina y catequina fueron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Se usó agua Milli-Q obtenida a partir de un sistema de Millipore (Bedford, MA, USA).

4.2.1.2. Metodología.

Las determinaciones del contenido en polifenoles totales, antocianos totales y taninos totales se hicieron espectrofotométricamente, de acuerdo a la metodología estandarizada propuesta por el *Australian Wine Research Institute* (métodos AWRI)²⁵

Para el estudio de los polifenoles y antocianos totales se procedió añadiendo a 0,2 ml del extracto de subproducto (el procedimiento de extracción se expuso en la sección 3.2), 3,8 ml de una disolución de HCl 1M. Se agitó y se dejó reposar 3 horas antes de medir. La absorbancia fue medida a 280 nm para polifenoles totales y a 520 nm para antocianos totales. Los resultados se expresaron como equivalentes de ácido gálico para polifenoles totales y de malvidina para antocianos totales, obtenidos a partir de sus correspondientes rectas de calibrado. Las rectas de calibrado fueron

²⁵ AWRI Standar Methods, 2009. https://www.awri.com.au/information_services/fact_sheets/

4. Caracterización del contenido polifenólico

realizadas a partir de 7 puntos por duplicado, en un rango de 1 - 40 ppm de ácido gálico para polifenoles totales y de 0,1 – 26 ppm de malvidina para los antocianos totales.

El método para la medida de los taninos totales se basa en la utilización de metilcelulosa precipitable. A 1 ml de extracto del subproducto, se le añadió 3 ml de una disolución de metilcelulosa al 0,04% p/v. Tras agitar y dejar reposar se adicionaron 2 ml de una disolución de sulfato de amonio saturada y 4 ml de agua. Tras 10 minutos se centrifugó y traspasó el sobrenadante a una cubeta para medir la absorbancia a 280 nm. El resultado se obtuvo por diferencia entre la absorbancia de un control (preparada de igual forma pero sin metilcelulosa) y la absorbancia de la muestra preparada. Los resultados se expresaron como la cantidad equivalente de catequina y se obtuvieron a partir de su correspondiente recta de calibrado. La recta de calibrado se realizó a partir de la medida de 7 puntos por duplicado, en un rango de concentración comprendido entre 5 – 50 ppm de catequina.

4.2.1.3. Tratamiento estadístico.

Todas las medidas fueron hechas por duplicado. Los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un análisis estadístico descriptivo a cada una de las variables, análisis de valores atípicos y se hizo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA). Se consideró como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. También se realizaron matrices de correlación. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

4.2.2. Resultados y discusión.

✓ Uva de vendimia.

Resulta interesante realizar, en primer lugar, el estudio de las uvas de vendimia a fin de establecer un punto de referencia y conocer las posibles peculiaridades y diferencias dadas por el fenómeno varietal.

A partir del análisis estadístico descriptivo de cada uno de los parámetros estudiados se pudo comprobar, en base a los datos del sesgo y curtosis estandarizada, que no existen desviaciones significativas de la normalidad. A partir de la prueba de Grubbs' y la prueba de Dixon se comprobó la no existencia de valores atípicos para todas las muestras estudiadas.

Atendiendo a los resultados obtenidos (*Tabla 1*), podemos decir que la variedad petit verdot fue la que mostró mayor contenido en polifenoles, antocianos y taninos totales. En cuanto al resto de variedades, cabe destacar la variedad tintilla de Rota por su contenido en antocianos totales y la cabernet sauvignon por su contenido en taninos totales.

A partir del análisis de las varianzas (ANOVA) de un solo factor se puso de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre las distintas variedades para el contenido en polifenoles totales ($p\text{-valor} = 0,0407$). La prueba de múltiples rangos desarrollada a partir del método de diferencias mínimas significativas de Fisher, mostró la existencia de dos grupos homogéneos, uno formado por la variedad variedad petit verdot y otro formado por el resto de variedades. En el análisis gráfico de sus medias y del test LSD de Fisher (*Figura 1*), se puede observar como el resultado de la variedad petit verdot se diferencia claramente del resto, estando muy por encima

4. Caracterización del contenido polifenólico

de la media grupal. Se encontraron diferencias significativas en el contenido en polifenoles totales entre las distintas vendimias estudiadas.

Tabla 1. Resultados del contenido medio en polifenoles totales, antocianos totales y taninos totales para las uvas de vendimia de las tres campañas estudiadas. Los resultados se muestran como el valor medio \pm su desviación estándar y han sido expresados como: equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico / g de uva) para polifenoles totales, equivalentes de malvidina (mg de malvidina / g de uva) para antocianos totales y equivalentes de catequina (mg de catequina / g de uva) para taninos totales.

Nota: no se pudo disponer de muestras de uva de tintilla de Rota en la vendimia de 2014.

MUESTRAS	POLIFENOLES TOTALES	ANTOCIANOS TOTALES	TANINOS TOTALES
Uva tempranillo	11,42 \pm 0,76	1,34 \pm 0,39	6,99 \pm 0,93
Uva tintilla de Rota	11,09 \pm 0,73	1,74 \pm 0,35	6,21 \pm 0,48
Uva cabernet sauvignon	11,33 \pm 0,42	1,20 \pm 0,08	7,65 \pm 2,75
Uva petit verdot	12,83 \pm 1,42	1,90 \pm 0,50	8,95 \pm 0,25
Uva syrah	11,45 \pm 1,05	1,35 \pm 0,28	7,25 \pm 2,53

Para los resultados de antocianos totales, también se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas variedades (p -valor = 0,0116). Se pueden establecer tres grupos homogéneos donde uno de ellos está formado por la variedad petit verdot y tintilla de Rota, ambos con valores muy superiores a la media. También se encontraron diferencias entre los resultados obtenidos en las distintas vendimias. La matriz de correlación realizada (*Figura 1*) muestra como el contenido polifenólico total se relaciona muy directamente con el contenido en antocianos totales ($r = 0,82$).

Finalmente, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el contenido en tantinos totales y la variedad de uva (p -valor = 0,1980), aunque si se encontraron con respecto al año de vendimia.

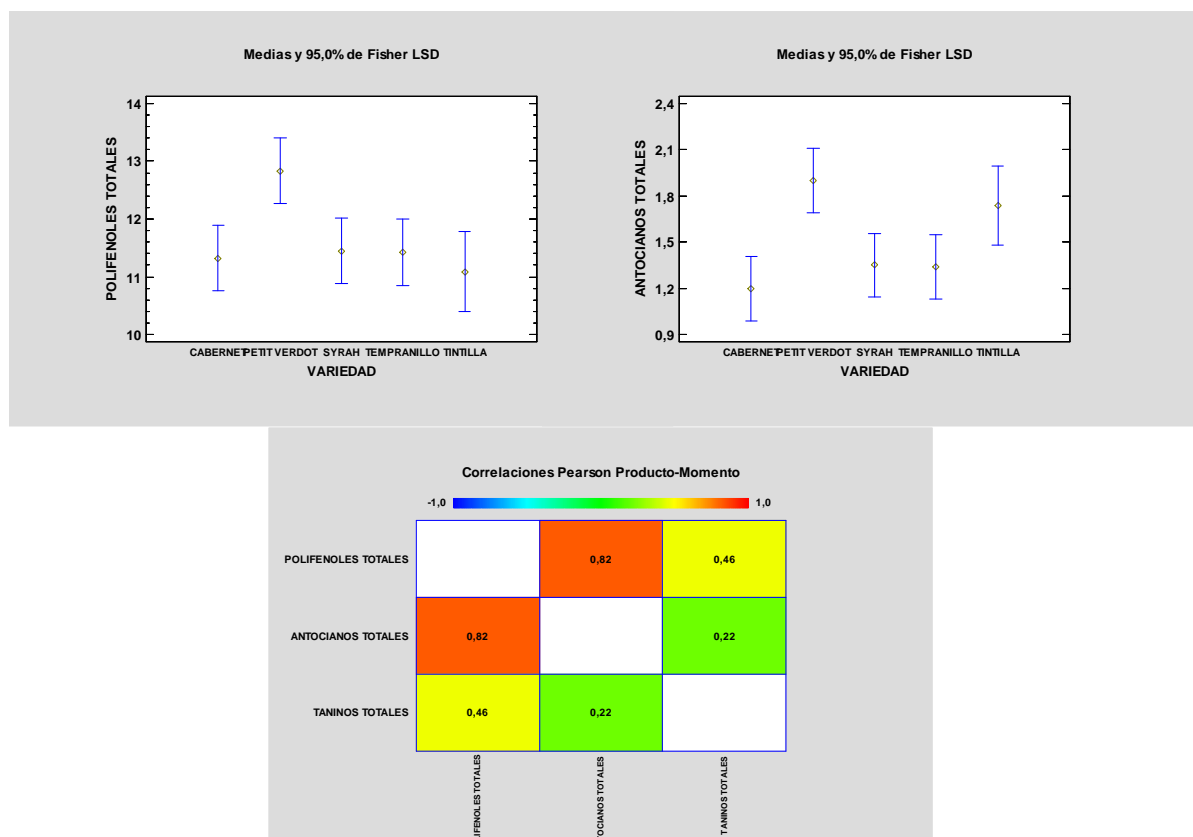


Figura 1. Gráficos de medias y test LSD de Fisher para los parámetros estudiados y matriz de correlación de Pearson.

✓ **Uva de aclareo.**

Como ya mencionamos en el apartado 3.1., las uvas de aclareo estudiadas corresponden a la vendimia de 2012, más las variedades tempranillo, cabernet sauvignon y syrah de la vendimia 2013. Todas las muestras fueron recogidas en

4. Caracterización del contenido polifenólico

estados próximos al envero, pero no presentaban exactamente el mismo estado de maduración, hecho que se pone de manifiesto con los datos de la madurez tecnológica (Baumé / acidez total) que se muestran en la *Tabla 2*. Esto implica que los datos obtenidos permiten evaluar el potencial de las uvas de aclareo a distintos niveles de maduración. Nos encontramos por tanto con dos variables a considerar: la variedad y el estado de maduración.

Los resultados medios de las muestras de uva de aclareo estudiadas se presentan en la *Tabla 2*. Los resultados del contenido polifenólico total mostraron importantes cantidades de polifenoles en la uva de aclareo para todas las variedades; del mismo orden, por kilo, a las encontradas en la uva de vendimia, que les vienen en este caso dadas fundamentalmente por sus contenidos en taninos. Las variedades petit verdot y cabernet sauvignon mostraron los valores más altos, si bien no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados de las distintas variedades de uva de aclareo (p -valor = 0,0545). Al estudiar el contenido polifenólico total en función de la madurez tecnológica, se encontraron diferencias significativas entre los distintos estados de maduración (p -valor = 0,0140). Las muestras con una madurez tecnológica próxima a 0,3 son las que mayor contenido polifenólico presentaron.

En relación al contenido en antocianos totales, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas variedades (p -valor = 0,4571), pero sí se volvieron a determinar diferencias para los distintos estados de maduración (p -valor = 0,0000). Pequeños cambios en la maduración dan lugar a importantes modificaciones en el resultado del contenido en antocianos. A partir de las matrices de correlación (*Figura 2*) se pone de manifiesto la importante relación existente entre ambas variables ($r = 0,8346$). Coeficientes de maduración tecnológica próximos a 0,6 dan lugar a cantidades en antocianos totales a considerar.

Tabla 2. Resultados de madurez tecnológica, polifenoles totales, antocianos totales y taninos totales para las muestras de uva de aclareo estudiadas. Los datos se presentan como el valor medio \pm su desviación estándar y han sido expresados como: equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico / g de uva de aclareo) para polifenoles totales, equivalentes de malvidina (mg de malvidina / g de uva de aclareo) para antocianos totales y equivalentes de catequina (mg de catequina / g de uva de aclareo) para taninos totales.

MUESTRAS	VENDIMIA	MADUREZ TECNOLÓGICA	POLIFENOLES TOTALES	ANTOCIANOS TOTALES	TANINOS TOTALES
Aclareo tempranillo	12	1,13	9,69 \pm 0,01	0,31 \pm 0,01	8,32 \pm 0,44
Aclareo tempranillo	13	0,27	11,94 \pm 0,02	0,13 \pm 0,02	12,52 \pm 0,24
Aclareo tintilla de Rota	12	0,14	10,80 \pm 0,00	0,01 \pm 0,00	12,82 \pm 0,46
Aclareo cabernet sauvignon	12	0,58	11,25 \pm 0,02	0,29 \pm 0,02	12,03 \pm 0,31
Aclareo cabernet sauvignon	13	0,17	12,88 \pm 0,01	0,04 \pm 0,01	14,00 \pm 0,19
Aclareo petit verdot	12	0,28	12,74 \pm 0,01	0,09 \pm 0,01	15,18 \pm 0,04
Aclareo syrah	12	0,56	9,65 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	8,66 \pm 0,36
Aclareo syrah	13	0,18	10,92 \pm 0,00	0,02 \pm 0,00	9,10 \pm 0,15

En el caso del contenido en taninos totales, sí se encontraron diferencias entre las distintas variedades. La prueba de múltiple rangos de Fisher mostró una clasificación de las muestras en tres grupos homogéneos. Destacaron la variedad petit verdot, con cantidades por encima de la media grupal, y la syrah con un contenido en taninos muy inferior a la media. De nuevo se hallaron diferencias entre los distintos estados de maduración. Cuanto mayor es el estado de maduración menor es el contenido en taninos, tal como muestra las correlaciones de Pearson. Este hecho es de esperarse teniendo en cuenta que estamos midiendo el contenido en taninos de la uva completa, es decir, la suma de los taninos del hollejo y de la pepita. Es sabido que durante la maduración los taninos del hollejo aumentan en contenido mientras que los de pepita disminuyen y que el contenido tánico de la pepita es muy superior al del hollejo. Al igual que con el contenido polifenólico total, estados de maduración tecnológica próximos a 0,3 dan lugar a los mayores contenidos en taninos totales.

4. Caracterización del contenido polifenólico

Por consiguiente, se concluye que la uva de aclareo posee importantes cantidades de polifenoles, del mismo orden por kg al de la uva de vendimia, aunque en este caso fundamentalmente se debe a su contenido en taninos. La influencia de los taninos en el contenido polifenólico total se evidencia a partir de su coeficiente de correlación ($r = 0,89$). La variedad no influye significativamente en el contenido en polifenoles totales y antocianos totales, sólo parece influir ligeramente en el contenido en taninos totales. Los resultados dependen de forma fundamental del estado exacto de madurez de la uva. Aunque todas las variedades fueron recogidas próximas al estado de envero, pequeños cambios en la maduración modifican de forma significativa el contenido polifenólico. Coeficientes de maduración tecnológica próximos a 0,3 dan los mayores resultados en taninos, y por tanto, en polifenoles totales de manera general. Por encima de 0,6 aumenta considerablemente el contenido en antocianos.

4. Caracterización del contenido polifenólico

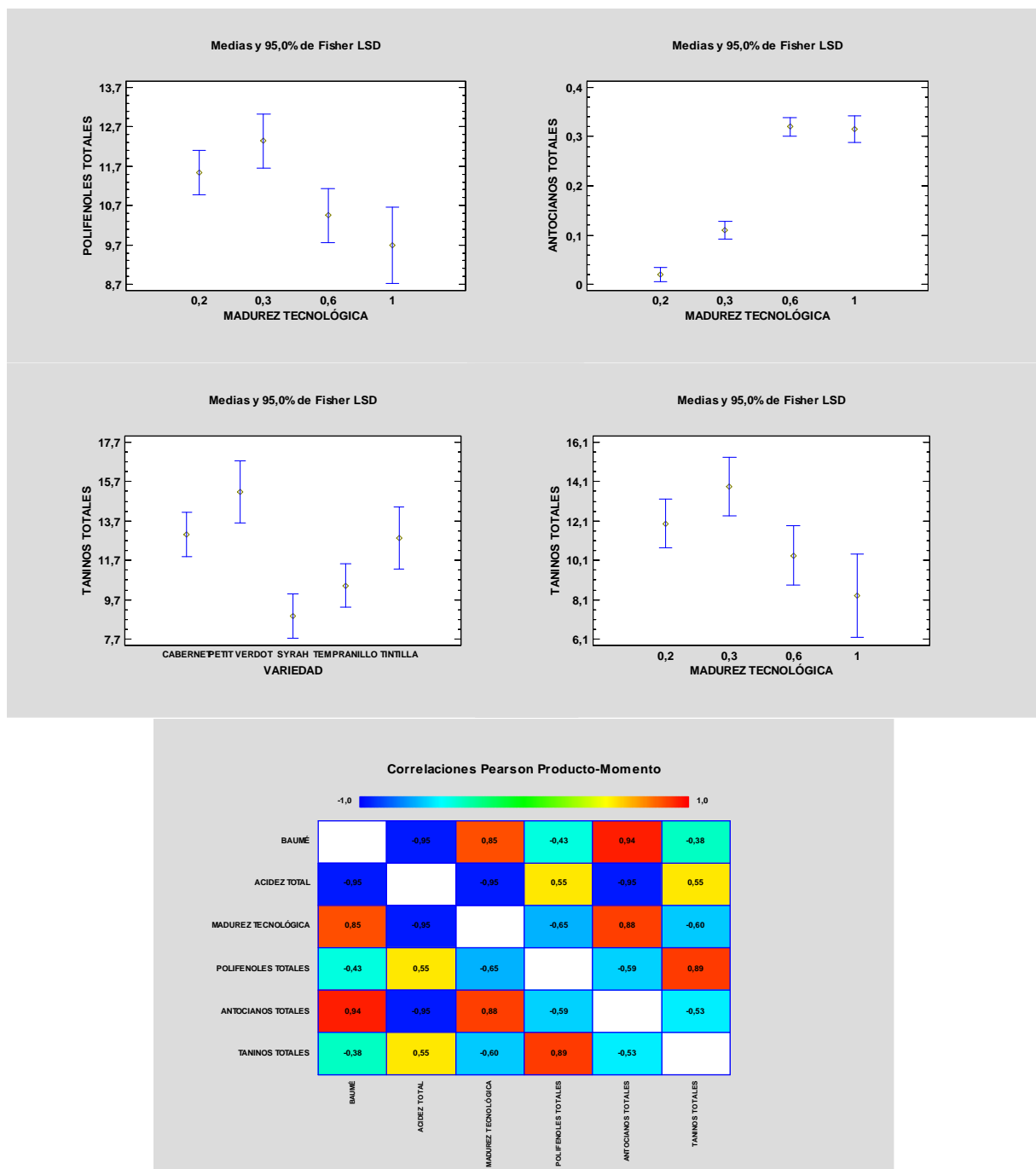


Figura 2. Gráficos de medias y test LSD de Fisher, y correlaciones de Pearson para los parámetros y variables influyentes.

✓ Orujos.

Los resultados para las muestras de orujos de las tres vendimias analizadas se muestran en la *Tabla 3*. En primer lugar hemos de destacar las importantes cantidades encontradas tanto de polifenoles totales, como de antocianos y taninos para todas las variedades estudiadas. Por kilogramo, el contenido polifenólico en los orujos sería superior al de la uva de vendimia.

En el estudio del contenido en polifenoles totales de los orujos, se realizó un análisis de la varianza donde se pudo observar como existen diferencias significativas entre las distintas variedades (p -valor = 0,0034), pero no se encuentran diferencias por año de vendimia (p -valor = 0,0505).

La variedad tempranillo es la que mostró un mayor contenido en polifenoles totales. A esta le siguió la variedad petit verdot. Ambas mostraron resultados por encima de la media grupal, formando un grupo de los tres que se diferencian según la prueba de múltiples rangos de Fisher.

Al comparar los resultados de los orujos con los de las uvas de vendimia, se observa como en ambos la variedad petit verdot destaca por su contenido en polifenoles. Por tanto, el mayor contenido en el orujo se debe a un fenómeno meramente varietal, ya que la uva de partida también poseía un mayor contenido polifenólico. Por otro lado, la variedad tempranillo despunta como la de mayor contenido polifenólico en orujos, mientras que en uva no se diferencia su contenido del resto de variedades. Este hecho indica una menor extractabilidad del contenido polifenólico general de esta variedad, la tempranillo, durante el proceso de vinificación.

4. Caracterización del contenido polifenólico

Tabla 3. Resultados del contenido polifenólico total, antocianos totales y taninos totales para las muestras de orujos estudiadas. Los resultados han sido expresados como: equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico / g de orujo) para polifenoles totales, equivalentes de malvidina (mg de malvidina / g de orujo) para antocianos totales y equivalentes de catequina (mg de catequina / g de orujo) para taninos totales. Los resultados se muestran como el valor medio \pm su desviación estándar.

Nota: no se pudo disponer de muestras de orujo de tintilla de Rota en la vendimia de 2014.

MUESTRAS	POLIFENOLES TOTALES VENDIMIA 2012	POLIFENOLES TOTALES VENDIMIA 2013	POLIFENOLES TOTALES VENDIMIA 2014	PROMEDIO VENDIMIAS
Orujo tempranillo	16,38 \pm 0,40	16,81 \pm 0,38	20,28 \pm 0,45	17,82 \pm 1,72
Orujo tintilla de Rota	14,57 \pm 0,99	14,68 \pm 0,54		14,63 \pm 0,65
Orujo cabernet sauvignon	14,29 \pm 0,08	16,50 \pm 0,12	13,57 \pm 0,06	14,79 \pm 1,37
Orujo petit verdot	14,53 \pm 0,69	18,12 \pm 0,13	16,85 \pm 0,15	16,50 \pm 1,66
Orujo syrah	13,73 \pm 0,02	15,72 \pm 0,59	15,23 \pm 0,32	14,90 \pm 0,98
MUESTRAS	ANTOCIANOS TOTALES VENDIMIA 2012	ANTOCIANOS TOTALES VENDIMIA 2013	ANTOCIANOS TOTALES VENDIMIA 2014	PROMEDIO VENDIMIAS
Orujo tempranillo	1,31 \pm 0,03	1,90 \pm 0,06	1,73 \pm 0,06	1,65 \pm 0,28
Orujo tintilla de Rota	2,34 \pm 0,21	1,79 \pm 0,05		2,07 \pm 0,34
Orujo cabernet sauvignon	0,61 \pm 0,02	0,93 \pm 0,02	0,91 \pm 0,01	0,82 \pm 0,16
Orujo petit verdot	1,95 \pm 0,11	2,40 \pm 0,02	1,78 \pm 0,02	2,04 \pm 0,29
Orujo syrah	1,52 \pm 0,06	2,30 \pm 0,16	1,82 \pm 0,01	1,88 \pm 0,36
MUESTRAS	TANINOS TOTALES VENDIMIA 2012	TANINOS TOTALES VENDIMIA 2013	TANINOS TOTALES VENDIMIA 2014	PROMEDIO VENDIMIAS
Orujo tempranillo	16,02 \pm 0,28	7,87 \pm 0,02	21,16 \pm 0,72	15,01 \pm 6,00
Orujo tintilla de Rota	14,66 \pm 0,56	6,93 \pm 0,08		10,80 \pm 4,48
Orujo cabernet sauvignon	15,95 \pm 0,67	12,19 \pm 0,80	5,92 \pm 0,32	11,35 \pm 4,56
Orujo petit verdot	12,68 \pm 1,20	11,52 \pm 0,11	11,63 \pm 0,13	11,94 \pm 0,79
Orujo syrah	11,02 \pm 1,05	6,12 \pm 0,10	10,22 \pm 0,71	9,12 \pm 2,52

Para el contenido en antocianos totales, el ANOVA de nuevo nos indica la no existencia de diferencias significativas por año de vendimia y la influencia de la variedad sobre los resultado (p-valor = 0,0000). En este caso se pueden establecer tres grupos de resultados homogéneos donde el de mayor contenido estaría formado por

4. Caracterización del contenido polifenólico

las variedades petit verdot, tintilla de Rota y syrah. Destaca la variedad cabernet sauvignon por mostrar un contenido excepcionalmente bajo.

Si comparamos los resultados con los obtenidos para las uvas de vendimia, se encuentran múltiples similitudes entre ambos tipos de muestras. Las muestras de mayor contenido en antocianos en uvas, petit verdot y tintilla de Rota, son las de mayor contenido en orujos. Este hecho indica que su contenido viene dado por un fenómeno varietal. Sólo se encuentran diferencias significativas para el caso de la variedad cabernet sauvignon. Si bien es cierto que la variedad cabernet sauvignon era la de menor contenido en antocianos en uva de vendimia, el estudio estadístico indicó resultados similares entre la cabernet, tempranillo y syrah. En el caso de los orujos, la variedad cabernet sauvignon se diferencia significativamente del resto de variedades, lo que indica una mayor difusión del contenido antociánico hacia el vino en esta variedad.

Por último, el contenido en taninos totales de los orujos no depende de la variedad de uva pero sí del año de vendimia muestreado ($p\text{-valor} = 0,0171$). Aunque estadísticamente no se pueden establecer diferenciaciones significativas entre las distintas variedades, fue la variedad tempranillo la que mayor contenido en taninos mostró en los orujos. Esto va en correlación con los datos obtenidos para los polifenoles totales. La matriz de correlación de Pearson (*Figura 3*), aun cuando no muestra importantes correlaciones entre ninguno de los parámetros, sí deja ver una mayor relación con el contenido en polifenoles totales para los taninos que para los antocianos, a diferencia de lo ocurrido en la uva de vendimia, en las que el contenido en antocianos y polifenoles totales estaba fuertemente relacionado. En consecuencia, podemos entender una menor relevancia del contenido en antocianos en la medida de polifenoles totales de orujos frente a otro tipo de polifenoles, lo que implicaría una mayor extractabilidad hacia el vino de este tipo de compuestos, los antocianos, con respecto a otro tipo de polifenoles como es el caso de los taninos.

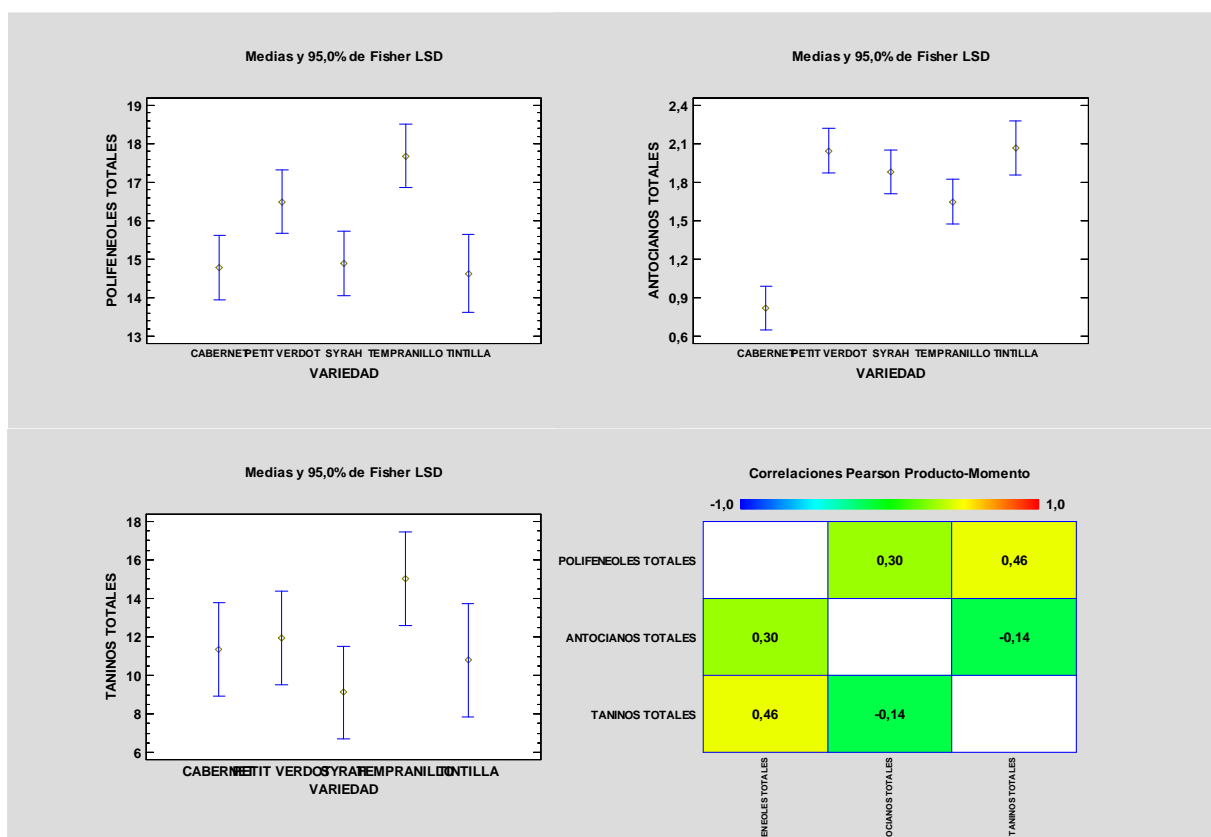


Figura 3. Gráficos de medias y test LSD de Fisher; matriz de correlación de Pearson para los parámetros estudiados.

Si hacemos un estudio de la variabilidad encontrada en los orujos entre las distintas vendimias, de manera promediada el coeficiente de variación obtenido para la medida de polifenoles totales es de un 8,01%, para antocianos totales es de un 17,19% y de un 30,95% para taninos totales, tal y como puede observarse en la *Tabla 4*. Si comparamos la variabilidad de las uvas de partida con respecto a las obtenidas para los orujos, puede observarse como la variedad tempranillo para polifenoles totales y la variedad cabernet sauvignon para polifenoles y antocianos totales presentan mayores dispersiones en orujos que en las uvas de partida. Este hecho nos viene a indicar que estas variedades se ven más afectadas por el proceso de

4. Caracterización del contenido polifenólico

maceración del hollejo, obteniéndose resultados más dispares para esos parámetros una vez concluido. Por el contrario, el resto de variedades tienden a tener contenidos más homogéneos en los orujos que en la uva de partida, luego la extracción producida durante el proceso de maceración tiende a homogenizar un poco los resultados para estas variedades con respecto a las distintas vendimias. En el caso de los taninos totales, para todas las variedades de orujo, a excepción de la syrah, aumenta la variabilidad por vendimia con respecto a la uva de partida. Esto coincide con el análisis estadístico realizado, que nos indicaba que en orujos sólo para la medida en taninos totales se podían establecer diferencias significativas por año de vendimia. Por consiguiente, podemos decir de forma general que el contenido en taninos se ve muy influenciado por la etapa de maceración del hollejo, dando lugar a mayores dispersiones en los resultados obtenidos para los orujos.

Tabla 4. Coeficientes de variación obtenidos para los resultados de las tres vendimias estudiadas para: (PT) polifenoles totales; (AT) antocianos totales y (TT) taninos totales.

UVA VENDIMIA				ORUJOS		
	CV PT	CV AT	CV TT	CV PT	CV AT	CV TT
Tempranillo	6,64	29,18	13,29	9,74	16,76	39,97
Tintilla	6,60	19,99	7,68	4,45	16,59	41,46
Cabernet	3,74	6,99	35,92	9,24	19,35	40,16
Petit verdot	11,07	26,31	2,82	10,06	14,28	6,59
Syrah	9,18	20,77	34,89	6,56	18,94	26,55
CV medios	7,45	20,65	18,92	8,01	17,19	30,95

4.2.3. Conclusiones.

- Las uvas de aclareo contienen, por kilo, una cantidad de compuestos polifenólicos similar a la de las uvas de vendimia, siendo particularmente ricas en taninos. La variedad de uva no influye en los contenidos en polifenoles y antocianos totales que podemos encontrar en la uva de aclareo. Sólo influye en el contenido en taninos totales, siendo la variedad petit verdot la que mostró mayor cantidad y la syrah la de menor.
- El factor determinante en los resultados de las uvas de aclareo es el estado exacto de maduración de la uva. Una maduración tecnológica próxima a 0,3 da los mayores resultados en polifenoles totales y taninos totales. Si está próxima a 0,6 se obtienen los mayores resultados para antocianos. En base a estos datos, estimamos que es necesario que la uva de aclareo tenga una maduración tecnológica de al menos 0,5 para que los racimos contengan compuestos polifenólicos en cantidad suficiente, tanto en taninos como en antocianos, como para que pueda resultar de interés su utilización.
- De forma promediada, el contenido polifenólico, por kilogramo, de los orujos es del orden de un 25% superior al de las uvas de vendimia. El contenido en polifenoles y antocianos totales de los orujos depende de la variedad de uva y no del año de vendimia. El contenido en taninos no depende de la variedad, sólo de la vendimia.
- Los orujos de la variedad petit verdot son unos de los que muestran mejores resultados en polifenoles y antocianos totales. La variedad tempranillo destaca por su contenido en polifenoles totales y la tintilla de Rota por su contenido en antocianos. La variedad cabernet sauvignon

muestra valores excepcionalmente bajos para antocianos. Los datos obtenidos para petit verdot y tintilla de Rota atienden a un fenómeno meramente varietal, ya que en la uva de vendimia se encontraron las mismas tendencias. Los resultados para tempranillo y cabernet sauvignon denotan diferencias en la extractabilidad de determinados compuestos hacia el vino para estas variedades. La variedad tempranillo parece tener una menor cesión de determinados compuestos hacia el vino, influyendo así en su contenido polifenólico total. Por su parte, la cabernet sauvignon posee una mayor tendencia de cesión de antocianos hacia el vino que otras variedades.

- De acuerdo a los resultados de estos parámetros generales, las variedades de orujos petit verdot y tintilla de Rota serían las más adecuadas para utilizar en base a su contenido polifenólico. La variedad menos recomendada sería la cabernet sauvignon.

4.3. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDOS BENZOICOS, ÁCIDOS CINÁMICOS Y FLAVANOLES.

4.3.1. Materiales y métodos.

4.3.1.1. Reactivos y disolventes.

Se utilizó acetronitrilo de grado de pureza HPLC de Panreac (Barcelona, España) y ácido acético de Merk (Darmstadt, Alemania). Los patrones de polifenoles fueron suministrados por Fluka (Buchs, Suiza), Merck (Darmstadt, Alemania) y Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA). Las curvas de calibrado se realizaron disolviendo los patrones en

una mezcla EtOH / H₂O (1:1). El agua utilizada fue Milli-Q, purificada mediante un sistema de Millipore (Bedford, MA, USA).

4.3.1.2. Metodología.

La determinación del contenido en ácidos fenólicos y flavanoles, de los subproductos objeto de estudio, se realizó mediante un sistema de cromatografía líquida de ultra-alta resolución o UPLC (*ultra-performance liquid chromatography*). La metodología empleada fue desarrollada por Schwarz et al.²⁶. Dicha metodología fue en primer lugar desarrollada para muestras de Brandy de Jerez; posteriormente, ha sido comprobada su utilidad para otro tipo de muestras vínicas mediante el método de adiciones estándar. Los análisis se realizaron en un sistema Acquity UPLC de Waters acoplado a dos detectores en serie: un detector ultravioleta-visible de matriz de fotodiodos y un detector de fluorescencia. La columna utilizada fue una Acquity UPLC BEH C18, de dimensiones 100 x 2,1 mm de diámetro interno y 1,7 µm de tamaño de partícula (Waters). La columna se mantuvo a una temperatura constante de 47°C. Se utilizaron dos eluyentes:

- Disolvente A: 3% acetonitrilo, 2% ácido acético y 95% agua Milli-Q.
- Disolvente B: 85% acetonitrilo, 2% ácido acético y 13% agua Milli-Q.

El gradiente utilizado fue: 0 min. 100% A; 3 min. 90% A; 6,5 min. 25% A. Entre los distintos análisis la columna fue lavada con 100% B durante 3 minutos y equilibrada con 100% A durante otros tres minutos. El flujo fue de 0,7 ml/min y el volumen de inyección de 2,5 µl. Los compuestos fueron identificados a partir de sus tiempos de retención, su espectro ultravioleta-visible y, en algunos casos, ratificado mediante la adición de patrones a las muestras. Su cuantificación se realizó mediante fluorescencia, utilizando una λ de excitación-emisión de: 290 – 350 nm para ácidos

²⁶ Schwarz, M. et al., *J. Sep. Sci.*, 2009, **32**, 1782-1790.

benzoicos y flavanoles, y de 340 – 420 nm para ácidos cinámicos²⁷. Las muestras fueron filtradas a través de membranas de tamaño de poro 0,22 µm antes de ser analizadas.

4.3.1.3. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado. Los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un análisis estadístico descriptivo a cada una de las variables. Se llevo a cabo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA). Se consideró como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. También se realizaron matrices de correlación. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

4.3.2. Resultados y discusión.

Se lograron identificar y cuantificar tres ácidos benzoicos: el ácido protocatéquico, ácidos vainílico y ácido sirínico; tres ácidos cinámicos: el ácido clorogénico, ácido cafeico y ácido ferúlico; dos flavan-3-oles: catequina y epicatequina; y un derivado del alcohol fenético, el tirosol. La cuantificación de estos compuestos se realizó a partir de sus correspondientes rectas de calibrado, hechas con seis puntos por duplicado, considerándose las áreas de los correspondientes picos cromatográficos. En la *Tabla 5* se muestran los intervalos de concentración para cada una de las rectas, así como los R^2 y límites de cuantificación y detección obtenidos a partir del calibrado. Como se realizó una calibración para cada una de las vendimias, presentamos valores medios de las tres campañas a modo de referencia. En la *Figura 4* se puede observar una muestra del perfil cromatográfico obtenido.

²⁷ Obón, J. M. et al., *J. Food Compos. Anal.*, 2011, **24**, 760-771.

Tabla 5. Intervalos de concentración y valores medios de R^2 , límites de detección y cuantificación de las rectas de calibrado obtenidas en cada vendimia. Las concentraciones y límites están expresados en ppm.

PATRÓN	RANGO CONCENTRACIÓN	R^2	LOD	LOQ
Ác. Protocatéquico	0,5 - 25	0,9969	0,414	1,380
Tirosol	0,5 - 25	0,9995	0,348	1,161
Ác. Vainílico	0,2 - 5	0,9995	0,065	0,218
Ác. Siríngico	0,3 - 15	0,9994	0,092	0,306
Ác. Clorogénico	0,3 - 15	0,9990	0,260	0,866
Ác. Cafeico	0,3 - 15	0,9997	0,144	0,481
Ác. Ferúlico	0,3 - 15	0,9985	0,260	0,868
Catequina	0,3 - 60	0,9998	0,260	0,868
Epicatequina	0,3 - 60	0,9999	0,190	0,633

✓ **Uva de aclareo.**

Los resultados obtenidos para la uva de aclareo se presentan en la *Tabla 10*. Se ha encontrado una gran variabilidad entre los resultados, obteniéndose rangos de concentración de 90,8 – 827,4 mg / kg uva de aclareo para los ácidos benzoicos, de 16,5 – 102,4 para los cinámicos y de 175,4 – 5160,4 mg / Kg de uva de aclareo para los flavanoles. Entre los compuestos estudiados, son la catequina y epicatequina los más abundantes en todas las muestras. Destacan por un lado las cantidades de ácido protocatéquico y tirosol, como ácidos benzoicos, y por otro los de ácido cafeico y clorogénico, como cinámicos. Por su parte, el ácido siríngico se ha detectado pero no ha podido ser cuantificado en ningún caso de uva de aclareo.

4. Caracterización del contenido polifenólico

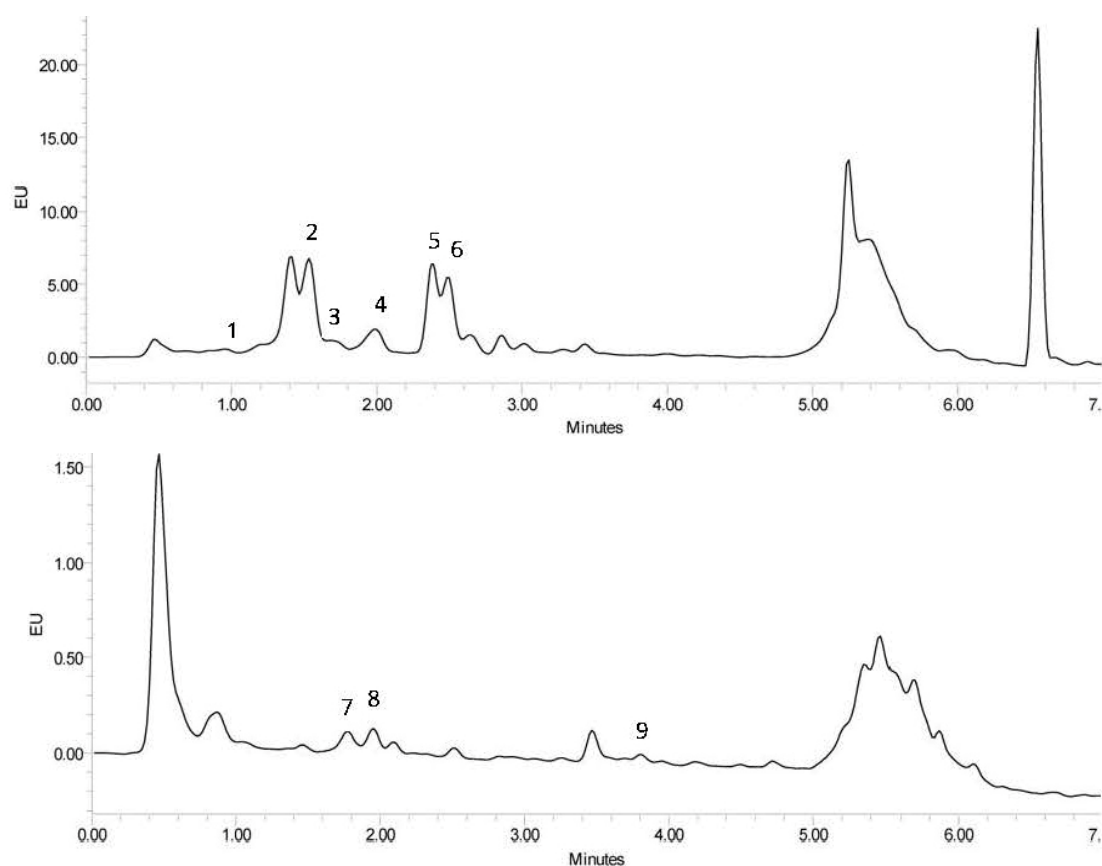


Figura 4. Perfil cromatográfico de las muestras estudiadas. Cromatograma de fluorescencia con λ excitación – λ emisión: (a) 290 – 350 nm; (b) 340 – 420 nm. (1) Ácido protocatéquico, (2) catequina, (3) tirosol, (4) ácido vainílico, (5) ácido sirínico, (6) epicatequina, (7) ácido clorogénico, (8) ácido cafeico y (9) ácido ferúlico.

A priori, se encuentran bastantes diferencias entre todas las muestras estudiadas. En el apartado anterior se concluyó que el contenido polifenólico de la uva de aclareo dependía fundamentalmente del estado de maduración de la uva y no de la variedad. Del estudio estadístico de cada uno de los compuestos estudiados independientemente, se obtuvo, igualmente, que no se pueden considerar diferencias significativas por variedades para ninguno de los polifenoles determinados, a excepción de para el ácido ferúlico. En el caso del ácido ferúlico, la variedad petit

verdot mostró el mayor contenido mientras que la tintilla de Rota despuntó como la menor. Cuando se estudian las diferencias existentes entre los distintos estados de maduración, aparecen diferencias estadísticamente significativas para el contenido en ácido vainílico, catequina y epicatequina. Para todos estos polifenóles se hallan mayores cantidades cuanto menor es la maduración, obteniéndose los mayores datos a una madurez tecnológica de 0,2.

A partir de la matriz de correlación establecida entre las distintas variables (Figura 5), se ponen de manifiesto importantes relaciones. La madurez tecnológica se correlaciona con la mayoría de los compuestos estudiados, a excepción de con el ácido clorogénico y ferúlico, siempre con signo inverso. A su vez, existen importantes correlaciones entre distintos compuestos, destacando las establecidas entre: catequina – epicatequina – ácido cafeico – tirosol – ácido vainílico.

Tabla 6. Datos medios \pm desviación estándar de los compuestos determinados en uva de aclareo. Los resultados se expresan en mg / Kg de uva de aclareo. N.Q.: no cuantificado.

UVA ACLAREO								
	TEMPRANILLO VEND'12	TEMPRANILLO VEND'13	TINTILLA DE ROTA VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'13	PETIT VERDOT VEND'12	SYRAH VEND'12	SYRAH VEND'13
Ác. protocatéquico	39,55 \pm 0,75	296,89 \pm 16,08	90,32 \pm 1,70	70,84 \pm 24,16	325,67 \pm 4,51	49,54 \pm 0,12	34,97 \pm 0,78	151,42 \pm 5,69
Tirosol	44,22 \pm 2,71	513,56 \pm 29,62	74,55 \pm 2,75	85,79 \pm 6,96	468,04 \pm 40,79	96,20 \pm 1,80	51,38 \pm 0,55	307,14 \pm 8,22
Ác. vainílico	5,33 \pm 0,40	16,98 \pm 0,06	8,73 \pm 0,24	10,96 \pm 0,08	22,06 \pm 0,14	12,90 \pm 0,72	6,49 \pm 0,13	15,54 \pm 0,17
Ác. siríngico	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Ác. clorogénico	14,03 \pm 4,74	14,11 \pm 0,53	13,85 \pm 4,58	11,12 \pm 1,78	11,22 \pm 1,56	9,83 \pm 0,06	10,63 \pm 1,68	N.Q.
Ác. cafeico	6,44 \pm 0,64	81,45 \pm 4,74	9,88 \pm 2,46	12,23 \pm 0,17	76,94 \pm 0,44	23,85 \pm 0,68	N.Q.	42,30 \pm 0,70
Ác. ferúlico	6,25 \pm 0,24	6,90 \pm 0,10	5,54 \pm 0,53	6,36 \pm 0,50	7,56 \pm 0,06	7,60 \pm 0,10	5,85 \pm 0,70	6,55 \pm 0,10
Catequina	111,12 \pm 1,20	1689,54 \pm 116,41	1039,98 \pm 15,32	1026,81 \pm 76,80	2881,42 \pm 163,58	1798,42 \pm 49,79	357,35 \pm 10,53	1493,32 \pm 85,92
Epicatequina	64,25 \pm 4,58	1091,25 \pm 10,91	448,82 \pm 4,96	380,51 \pm 30,14	2279,02 \pm 5,58	646,82 \pm 11,29	281,97 \pm 16,28	2297,10 \pm 42,49

4. Caracterización del contenido polifenólico

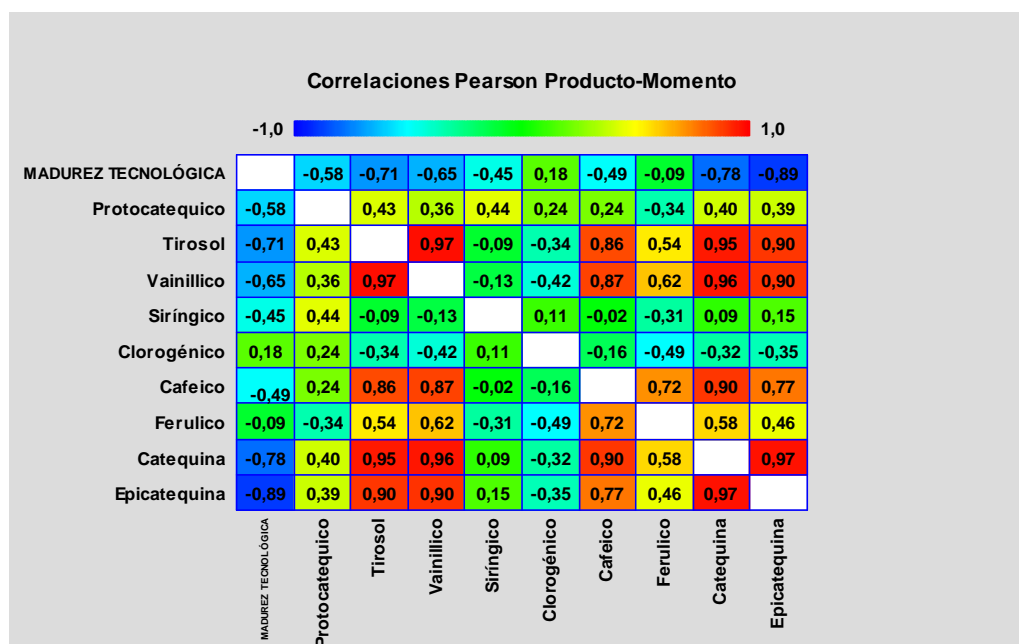


Figura 5. Matriz de correlación de Pearson para los datos estudiados en uva de aclareo.

✓ Orujos.

Se pueden observar los resultados obtenidos para las muestras de orujo en la *Tabla 11*. Los rangos de concentración obtenidos para los ácidos benzoicos fueron de 275,6 mg / kg de orujo de la variedad syrah a 349,1 mg / kg de la tempranillo. Para los ácidos cinámicos se obtuvieron de 20,7 – 34,9 mg / kg orujo para tempranillo y tintilla de Rota respectivamente. En el caso de los flavanoles, el valor mínimo obtenido fue de 218,8 mg / Kg de orujo para la tintilla de Rota y el máximo de 710,7 mg / kg de la variedad petit verdot. En el caso particular de los orujos, se ha detectado pero no se ha podido cuantificar el contenido en ácido ferúlico para ninguna variedad en ninguna de las vendimias analizadas. Tampoco el de ácido cafeico, a excepción de para el orujo de la variedad petit verdot. La casi no presencia de estos compuestos en los orujos estudiados, puede ser debida a una mayor difusión de dichos compuesto hacia el vino, mayor reactividad y/o inestabilidad.

En los orujos, las cantidades de catequina, epicatequina y ácido protocatéquico son las más elevadas. A continuación, resultan también destacables las de tirosol y ácido siríngico. El estudio estadístico muestra diferencias significativas entre los resultados obtenidos en cada una de las vendimias estudiadas. Se calcularon los coeficientes de variación medios entre las distintas vendimias hallándose valores del 26,59% para el contenido en ácidos fenólicos y del 32,51% para el contenido de flavanoles. Por variedad, sólo aparecen diferencias significativas entre las cantidades de catequina y epicatequina, y por supuesto también para el ácido cafeico, que sólo fue hallado en la variedad petit verdot. La variedad con mayor contenido en catequina fue la petit verdot seguida de la cabernet sauvignon. Con respecto a la epicatequina, de nuevo es la variedad petit verdot la de mayor contenido seguida, en este caso, por la tempranillo (*Figura 6*).

El estudio de correlación sólo mostró relación a destacar entre el contenido en catequina y epicatequina ($r = 0,82$) y el de ácido vainílico y protocatéquico ($r = 0,69$).

Tabla 7. Resultados medios de los polifenoles determinados en las tres vendimias analizadas. Los resultados se muestran como la media \pm desviación estándar, en mg / Kg de orujo. N.Q.: no cuantificado.

	ORUJOS				
	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH
Ác. protocatéquico	177,32 \pm 49,32	176,84 \pm 7,95	132,22 \pm 68,72	135,18 \pm 69,26	123,63 \pm 51,79
Tirosol	84,54 \pm 13,09	60,51 \pm 2,50	92,92 \pm 48,45	84,14 \pm 24,97	84,84 \pm 31,79
Ác. vainílico	18,02 \pm 3,69	20,34 \pm 3,44	16,72 \pm 5,66	15,91 \pm 4,37	17,23 \pm 3,01
Ác. siríngico	69,20 \pm 24,47	46,43 \pm 14,25	36,85 \pm 18,88	48,35 \pm 12,76	49,87 \pm 21,90
Ác. clorogénico	20,66 \pm 6,86	34,86 \pm 2,72	24,53 \pm 9,16	21,50 \pm 7,04	26,48 \pm 7,76
Ác. cafeico	N.Q.	N.Q.	N.Q.	11,88 \pm 0,88	N.Q.
Ác. ferúlico	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
Catequina	235,32 \pm 57,94	157,84 \pm 35,06	311,11 \pm 119,92	473,36 \pm 170,74	139,42 \pm 52,18
Epicatequina	133,90 \pm 50,42	60,98 \pm 15,79	112,21 \pm 45,47	237,34 \pm 76,26	116,16 \pm 34,96

4. Caracterización del contenido polifenólico

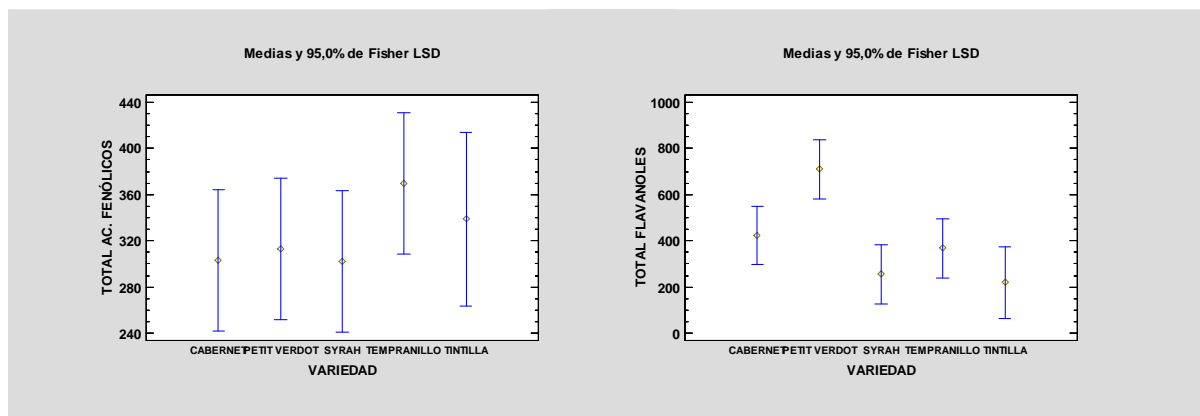


Figura 6. Gráficos de medias y test LSD de Fisher para el contenido en ácidos fenólicos totales y flavanoles totales de los orujos de las tres vendimias analizadas por variedad.

4.3.3. Conclusiones.

- Se han podido determinar 3 ácidos benzóicos, 3 ácidos cinámicos, 2 flavan-3-oles y un derivado del alcohol fenetílico.
- En la uva de aclareo destacan los contenidos en catequina y epicatequina, seguidos de los de ácido protocatéquico, tirosol, ácido cafeico y clorogénico. En el aclareo no se encuentra ácido siríngico.
- Los resultados obtenidos para la uva de aclareo muestran mucha variabilidad, con cantidades totales desde 292,9 a 6071,91 mg / Kg de uva de aclareo. Se confirma la no influencia de la variedad en los resultados obtenidos, pero sí la del estado de maduración. La gran mayoría de los compuestos estudiados dependen fuertemente de su estado exacto de maduración, encontrándose los mejores resultados para estas familias de compuestos a una madurez tecnológica próxima a 0,2.

- En los orujos no se encuentra ácido ferúlico ni cafeico (a excepción del cafeico para la variedad petit verdot). Los compuestos mayoritarios hallados son la catequina, epicatequina y ácido protocatéquico, seguidos de tirosol y ácido sirínico.
- Para los orujos las variedades se diferencian por su contenido en catequina y epicatequina. La variedad petit verdot se muestra como la de mayor contenido en estos compuestos. Los rangos de concentración de la suma de todos los compuestos identificados van desde 557,6 mg / Kg de orujo de la variedad syrah a 1023,7 mg / kg de la variedad petit verdot. A la variedad petit verdot le siguen en contenido la variedad tempranillo y cabernet sauvignon.

4.4. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EN FLAVONOLES Y ANTOCIANINAS.

4.4.1. Materiales y métodos.

4.4.1.1. Reactivos y disolventes.

Se utilizó ácido fórmico de grado analítico y metanol de grado de pureza para HPLC de Panreac (Barcelona, España). Se emplearon patrones de quercetina y cloruro de pelargonidina suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA). Las curvas de calibrado se realizaron disolviendo los patrones en una mezcla EtOH / H₂O (1:1) acidificado con HCl de Panreac (Barcelona, España) hasta pH = 2. El agua utilizada fue Milli-Q, purificada mediante un sistema de Millipore (Bedford, MA, USA).

4.4.1.2. Metodología.

Antes del análisis, las muestras fueron acidificadas con HCl hasta pH = 2 y se dejaron reposar tres horas. Todas las muestras fueron filtradas a través de membranas de tamaño de poro de 0,22 µm. La identificación de los antocianos y flavonoles individuales se realizó mediante comparación con datos bibliográficos²⁸ y se corroboró con el análisis de algunas muestras mediante un UPLC acoplado, vía ionización por electrospray, a un espectrómetro de masas API Q-TOF (Synapt G2, Waters Corp., Milford, MA USA). Se utilizó una columna de fase reversa C18 (Acquity UPLC BEH C18, Waters) de 2.1 mm x 100 mm y 1.7 µm de tamaño de partícula. Los eluyentes empleados fueron agua acidificada con ácido fórmico al 2% como solvente A y metanol como solvente B, a un flujo de 0,4 ml / min y el siguiente gradiente: 0 min, 15% B; 3.30 min, 20% B; 3.86 min, 30% B; 5.05 min, 40% B; 5.35 min, 55% B; 5.64 min, 60% B; 5.94 min, 95% B; 7.50 min, 95% B. El volumen de inyección fue de 3 µl. Las condiciones de operación del ESI fueron: flujo del gas de desolvatación = 700 L h⁻¹; temperatura de desolvatación = 500 °C; flujo del gas de cono = 10 L h⁻¹; temperatura de la fuente = 150 °C; voltaje del capilar = 700 V; voltaje del cono = 30 V y energía de colisión = 20 eV. Se utilizó el modo *full-scan* (m/z = 100 – 1200), con ionización ESI + para antocianidinas y ESI – para flavonoles.

La cuantificación fue realizada en un UPLC LaChrom Ultra system (Hitachi), equipado con un detector L-2420U UV-Vis y una columna Halo C18 de 3 mm de diámetro interno, 100 mm de longitud y 2,7 µm de tamaño de partícula. La temperatura de la columna se mantuvo a 50 °C y el volumen de inyección fue de 15 µl. Se utilizaron como eluyentes agua acidificada (5% ácido fórmico) (disolvente A) y metanol (disolvente B) con un flujo de 1 ml/min. El gradiente utilizado fue: 0 minutos 15% B; 1,5 minutos 20% B; 3,3 minutos 30% B; 4,8 minutos 40% B; 5,4 minutos 55% B;

²⁸ Guerrero, R. F. *et al.*, *Food Chem.*, 2009, **112**, 949-955.

elución isocrática 55% B hasta los 7 minutos. La cuantificación se realizó a 360 nm para los flavonoles y a 520 nm para las antocianinas.

4.4.1.3. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un análisis estadístico descriptivo a cada una de las variables. Se llevo a cabo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA), considerándose como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. También se realizaron matrices de correlación. En base a los resultados, se aplicó un análisis de discriminates a los datos de orujos (no se realizó en las uvas de aclareo por no disponer de un número de observaciones elevado). Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

4.4.2. Resultados y discusión.

La identificación de los compuestos se llevo a cabo mediante los espectros de masas y su comparación con datos bibliográficos. Los compuestos se identificaron a partir de las señales de los correspondientes iones moleculares y el fragmento correspondiente a la forma aglicona de la molécula. Se lograron identificar un total de cinco flavonoles y diez antocianinas. Los flavonoles fueron: miricetin-3-glucurónido, miricetin-3-glucósido, quercetin-3-glucurónido, quercetin-3-rutinósido y kaempferol-3-glucósido. Las antocianinas determinadas consistieron en: la delfinidin-3-glucósido, cianidin-3-glucósido, petunidin-3-glucósido, peonidin-3-glucósido, malvidin-3-glucósido, malvidin-3-(6-O-acetil)-glucósido, (cis) malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido, malvidin-3-(6-O-cafeoil)-glucósido, petunidin-3-(6-O-p-cumaroil)glucósido y

4. Caracterización del contenido polifenólico

(trans) malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido. En las *Figura 9 y 10* se muestran un ejemplo representativo de los perfiles cromatográficos obtenidos para flavonoles y antocianinas.

La cuantificación se realizó a partir de una recta de calibrado realizada con quercetina para flavonoles y con cloruro de pelargonidina para antocianinas. Ambas rectas se obtuvieron a partir de seis puntos por duplicado, considerándose las áreas de los correspondientes picos cromatográfico. Pueden observarse en la *Tabla 8* los intervalos de concentración utilizados para la realización de los calibrados, así como los datos medios de los R^2 y límites de detección y cuantificación obtenidos, a partir del calibrado, para las tres vendimias estudiadas.

Tabla 8. Datos medios de los intervalos de concentración, valores de R^2 , límites de detección y cuantificación de las rectas de calibrado obtenidas en las distintas vendimia. Las concentraciones y límites están expresados en ppm.

PATRÓN	RANGO CONCENTRACIÓN	R^2	LOD	LOQ
Quercetina	0,2 - 50	0,9999	0,130	0,433
Cloruro de pelargonidina	0,075 - 45	0,9998	0,016	0,055

✓ Uva de aclareo.

Los resultados obtenidos para la uva de aclareo pueden verse en las *Tablas 9 y 10*. Como se puede observar, los compuestos flavonoles mayoritarios son los derivados de miricetina. El rango de concentración de flavonoles totales encontrados va desde 48,5 – 58,6 mg / Kg de uva de aclareo. En el caso de las antocianinas, el compuesto mayoritario es el glucósido de malvidina y ha este le siguen en cantidad varios derivados de la malvidina como el cumaroil y acetil glucósido de malvidina. Los

resultados de antocianinas muestran una gran variabilidad entre las distintas muestras analizadas. Los rangos de concentración de antocianinas totales hallados van desde 20,3 – 352,1 mg / Kg de uva de aclareo.

Atendiendo a los flavonoles individuales, sólo existen diferencias significativas en el contenido en miricetin-3-glucósido por variedad. La variedad tintilla de Rota se diferencia con una mayor cantidad claramente del resto, que muestran contenidos similares. En relación a la posible influencia del estado de maduración, sólo se pueden establecer diferencias para el miricetin-3-glucurónido y el kaempferol-3-glucósido. En el caso de los flavonoles, a mayor madurez tecnológica mayor contenido se encuentra.

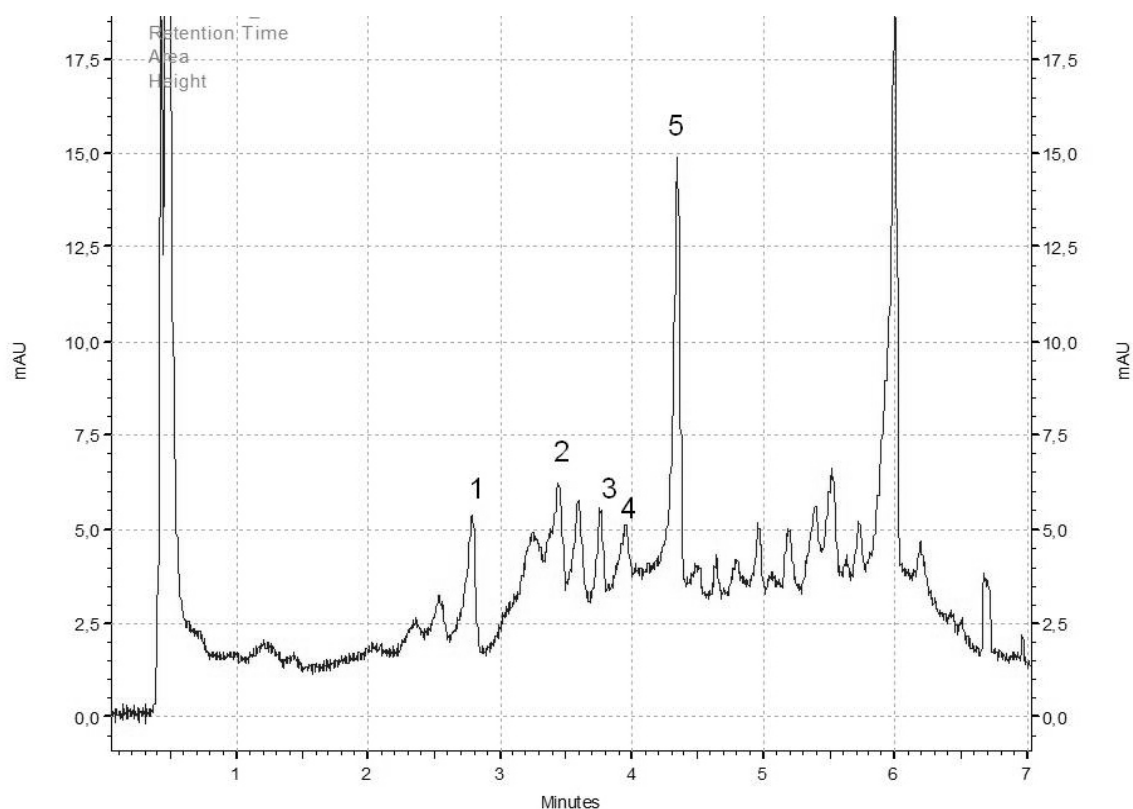


Figura 7. Cromatograma tipo para flavonoles a 360 nm. (1) Miricetin-3-glucurónido; (2) miricetin-3-glucósido; (3) quercetin-3-glucurónido; (4) quercetin-3-rutinósido; (5) kaempferol-3-glucósido.

4. Caracterización del contenido polifenólico

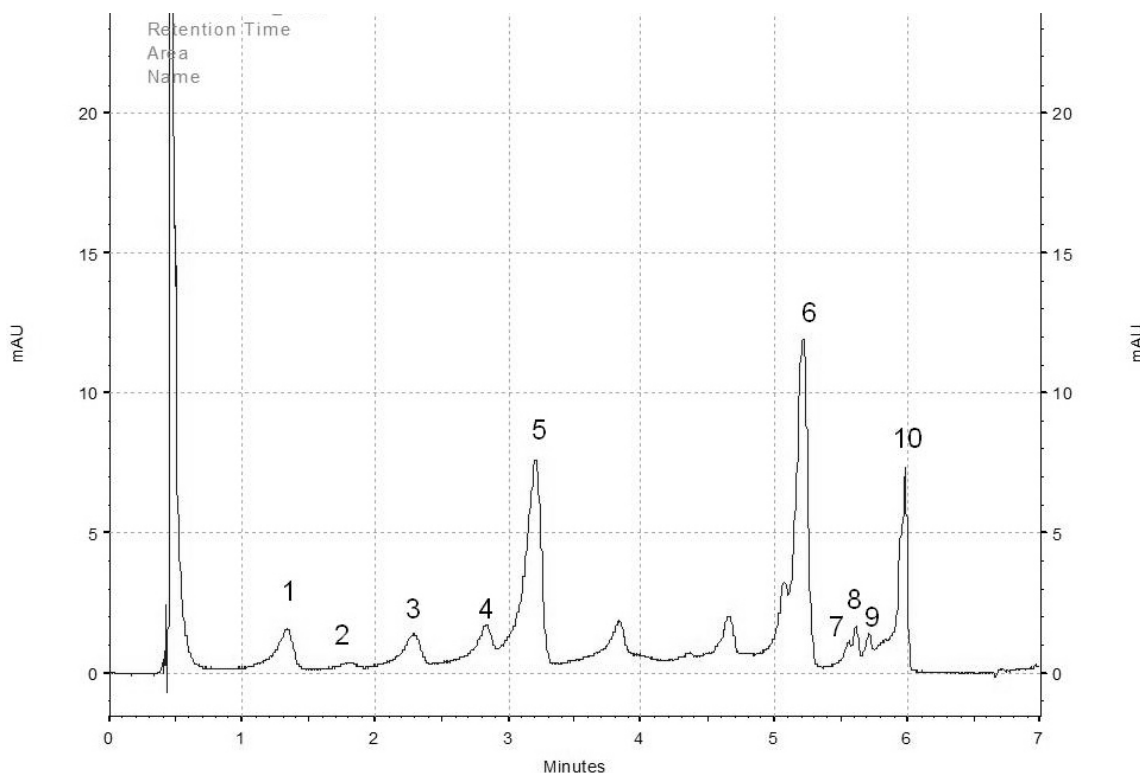


Figura 8. Perfil cromatográfico obtenido para antocianinas a 520 nm. (1) Delfinidin-3-glucósido; (2) cianidin-3-glucósido; (3) petunidin-3-glucósido; (4) peonidin-3-glucósido; (5) malvidin-3-glucósido; (6) malvidin-3-(6-O-acetil)-glucósido; (7) (cis) malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido; (8) malvidin-3-(6-O-cafeoil)-glucósido; (9) petunidin-3-(6-O-p-cumaroil)glucósido; (10) (trans) malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido.

Cuando se analiza el contenido total en flavonoles, aparecen diferenciaciones por variedad pero no, en este caso, con respecto a la madurez. La variedad tintilla de Rota se separa del resto con un mayor contenido total (*Figura 9*). Se han encontrado correlaciones entre la madurez tecnológica y el contenido en miricetin-3-glucurónido y kaempferol-3-glucósido con $r = 0,86$ y $r = 0,91$ respectivamente. Otras correlaciones encontradas a destacar son: quercetin-3-gucurónido - quercetin-3-rutinónisido con $r = 0,89$ y miricetin-3-glucurónido – kaempferon-3-glucósido con $r = 0,89$.

En relación al contenido en antocianinas, de forma individual, para la uva de aclareo, no se establecen diferenciaciones entre variedades pero si aparecen diferencias estadísticamente significativas entre cada uno de las antocianinas determinadas y el estado de maduración de la uva analizada. Lo mismo ocurre cuando se tratan los valores suma de todas las antocianinas para cada muestra (*Figura 9*). Con una madurez tecnológica próxima a 0,6 se obtienen valores de antocianinas a considerar. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos en la medida del contenido total de antocianos. En cuanto al estudio de las correlaciones, aparecen importantes correlaciones entre casi todas las antocianinas entre sí y, por supuesto, entre estas y el parámetro de madurez tecnológica.

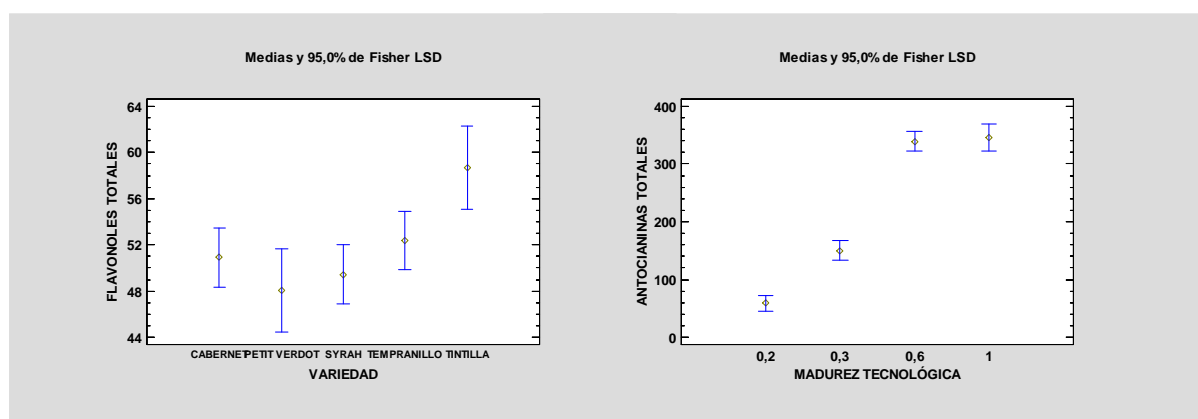


Figura 9. Gráficos de medias y test LSD de Fisher para las variables diferenciadoras en el contenido suma de los flavonoles identificados individualmente y antocianinas individuales de las uvas de aclareo.

4. Caracterización del contenido polifenólico

Tabla 9. Resultados sobre el contenido en flavonoles de la uva de aclareo. Los datos se han expresado como el valor medio \pm la desviación estándar en mg equivalentes de quercetina / Kg de uva de aclareo.

UVA ACLAREO								
	TEMPRANILLO VEND'12	TEMPRANILLO VEND'13	TINTILLA DE ROTA VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'13	PETIT VERDOT VEND'12	SYRAH VEND'12	SYRAH VEND'13
Miricetin-3-glucurónido	12,53 \pm 0,50	9,65 \pm 0,12	6,50 \pm 0,60	11,27 \pm 0,23	9,02 \pm 0,25	9,04 \pm 0,45	11,98 \pm 1,43	8,70 \pm 0,30
Miricetin-3-glucósido	15,12 \pm 1,16	13,62 \pm 0,76	31,66 \pm 3,02	15,09 \pm 0,13	17,05 \pm 0,35	15,44 \pm 1,07	10,63 \pm 1,24	15,67 \pm 1,53
Quercetín-3-glucurónido	7,42 \pm 0,21	8,65 \pm 0,12	6,43 \pm 0,04	6,97 \pm 0,53	7,99 \pm 0,16	7,11 \pm 0,00	6,90 \pm 0,98	8,63 \pm 0,03
Quercetín-3-rutinósido	8,18 \pm 0,00	8,64 \pm 0,18	6,82 \pm 0,30	7,51 \pm 0,19	8,75 \pm 0,36	7,44 \pm 0,47	7,68 \pm 1,41	8,07 \pm 0,21
Kaempferol-3-glucósido	13,00 \pm 0,63	7,95 \pm 0,18	7,25 \pm 0,09	10,08 \pm 0,64	8,25 \pm 0,57	9,05 \pm 0,51	12,41 \pm 0,80	8,07 \pm 0,21

Tabla 10. Cantidades de antocianinas encontradas en la uva de aclareo. Los datos se han expresado como el valor medio \pm la desviación estándar en mg equivalentes de pelargonidina / Kg de uva de aclareo. N.D.: no detectado.

UVA ACLAREO								
	TEMPRANILLO VEND'12	TEMPRANILLO VEND'13	TINTILLA DE ROTA VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'13	PETIT VERDOT VEND'12	SYRAH VEND'12	SYRAH VEND'13
Delfinidin-3-glucósido	22,09 \pm 0,78	15,81 \pm 0,07	N.D.	18,29 \pm 0,28	7,64 \pm 0,68	5,53 \pm 0,16	7,94 \pm 0,12	4,88 \pm 0,16
Cianidin-3-glucósido	5,94 \pm 0,18	11,06 \pm 0,26	N.D.	4,58 \pm 0,04	6,26 \pm 0,00	3,47 \pm 0,01	4,12 \pm 0,19	4,07 \pm 0,05
Petunidin-3-glucósido	23,78 \pm 0,80	15,65 \pm 0,90	N.D.	15,90 \pm 0,42	6,89 \pm 0,26	6,21 \pm 0,34	13,45 \pm 0,25	5,93 \pm 0,11
Peonidin-3-glucósido	15,01 \pm 0,67	19,63 \pm 0,34	3,75 \pm 0,16	18,24 \pm 0,45	6,66 \pm 0,25	7,27 \pm 0,19	24,22 \pm 1,73	5,73 \pm 0,10
Malvidin-3-glucósido	97,19 \pm 2,33	41,34 \pm 1,89	6,77 \pm 0,86	93,21 \pm 3,15	19,13 \pm 0,03	40,75 \pm 4,16	100,40 \pm 2,91	17,74 \pm 0,43
Malvidin-3-(6-O-acetil)-glucósido	34,48 \pm 0,78	9,69 \pm 0,05	4,12 \pm 0,29	109,61 \pm 1,65	16,60 \pm 0,21	32,05 \pm 2,08	60,98 \pm 1,79	8,39 \pm 0,58
Malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (cis)	21,42 \pm 1,14	8,76 \pm 0,12	N.D.	11,99 \pm 1,10	5,57 \pm 0,13	7,40 \pm 0,30	29,41 \pm 1,70	5,94 \pm 0,21
Malvidin-3-(6-O-cafeoil)-glucósido	28,85 \pm 1,25	5,06 \pm 0,24	N.D.	12,97 \pm 1,24	4,50 \pm 0,05	10,63 \pm 1,60	33,75 \pm 1,01	4,78 \pm 0,13
Petunidin-3-(6-O-p-cumaroil)glucósido	26,03 \pm 1,45	7,92 \pm 0,54	N.D.	10,88 \pm 2,31	5,02 \pm 0,20	8,07 \pm 0,13	19,23 \pm 4,16	5,96 \pm 0,42
Malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (trans)	70,78 \pm 5,52	10,62 \pm 0,19	5,66 \pm 0,50	30,90 \pm 2,14	6,52 \pm 0,10	33,62 \pm 1,08	58,58 \pm 2,28	7,77 \pm 0,54

✓ **Orujos.**

En las *Tablas 11 y 12* se presentan los resultados obtenidos para el contenido en flavonoles y antocianinas de los orujos estudiados. Los contenidos en flavonoles hallados para los orujos van desde 68,9 – 138,7 mg / Kg de orujo, obtenidos para la variedad cabernet sauvignon y tintilla de Rota respectivamente. Al igual que ocurrió con la uva de aclareo, los derivados de miricetina junto al kaempferol-3-glucósido fueron los flavonoles más abundantes. De manera individual, se encuentran diferencias significativas por variedad para los compuestos miricetin-3-glucurónido, quercetin-3-glucurónido y kaempferol-3-glucósido, presentando las cantidades más abundantes de estos compuestos las variedades tintilla de Rota, petit verdot y syrah respectivamente. Si se analizan los contenidos totales de flavonoles se observan diferencias en el contenido por variedad, pudiéndose establecer tres grupos homogéneos, donde las variedades tintilla de Rota, syrah y petit verdot forman el grupo de mayor contenido. A su vez, destaca la variedad cabernet sauvignon por el bajo contenido en flavonoles encontrado. Estadísticamente no se pueden establecer diferencias en el contenido de flavonoles totales por año de vendimia. No se han encontrado correlaciones a destacar entre los flavonoles determinados.

Las cantidades de antocianinas halladas en los orujos van desde 587,7 mg / Kg de orujo de la variedad cabernet sauvignon hasta los 1807,7 mg / Kg del orujo de la variedad syrah. De nuevo es el glucósido de malvidina el antociano mayoritario, seguido del cumaroil y acetil glucósido de malvidina. No se pudo determinar el glucósido de cianidina para las variedades de orujo de tintilla de Rota, cabernet sauvignon y petit verdot. De forma individual se encuentran diferencias en los contenidos de cada una de las antocianinas y la variedad de orujo. La variedad tintilla de Rota destaca por su contenido en glucósido de peonidina y de malvidina, la petit verdot por el de acetil glucósido de malvidina y la syrah por el de cafeoil y cumaroil glucósido de malvidina y cumaroil glucósido de petunidina. Si se consideran los

4. Caracterización del contenido polifenólico

contenidos totales, se encuentran diferencias por variedad, pudiéndose establecer tres grupos homogéneos donde las variedades syrah, tintilla de Rota y petit verdot forman el de mayor contenido. En esta ocasión, la variedad cabernet sauvignon vuelve a diferenciarse por su bajo contenido. Estos resultados coinciden con los encontrados en el estudio de los antocianos totales. No se establecen diferencias estadísticamente significativas entre los contenidos totales de antocianinas por año de vendimia. Este resultado también coincide con lo obtenido en la medida global de antocianos totales. En el caso de las antocianinas en orujo no se encontraron relaciones a destacar en la matriz de correlación realizada.

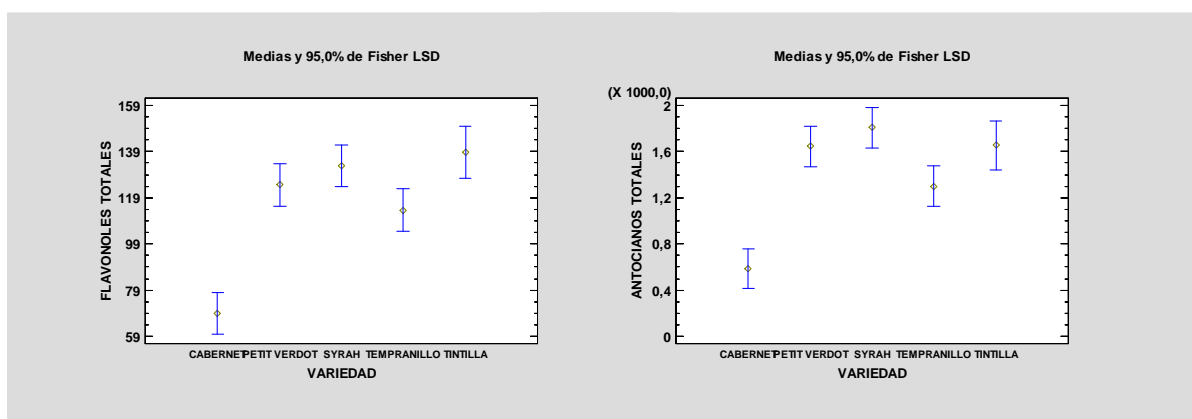


Figura 10. Gráficos de medias y test LSD de Fisher para el contenido en flavonoles totales y antocianinas totales de los orujos estudiados por variedad.

Tabla 11. Resultados obtenidos para flavonoles en orujos. Los datos se muestran como el valor medio \pm la desviación estándar en mg equivalentes de quercetina / Kg de orujo.

	ORUJOS				
	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH
Miricetin-3-glucurónido	25,15 \pm 3,74	47,92 \pm 4,67	19,27 \pm 2,34	33,33 \pm 3,54	24,11 \pm 4,44
Miricetin-3-glucósido	16,56 \pm 3,62	17,55 \pm 5,23	17,57 \pm 2,29	19,12 \pm 1,63	21,53 \pm 6,63
Quercetín-3-glucurónido	12,98 \pm 0,52	12,51 \pm 0,84	10,05 \pm 1,39	15,50 \pm 1,49	12,71 \pm 1,84
Quercetín-3-rutinósido	11,82 \pm 0,77	13,10 \pm 2,10	10,31 \pm 1,60	11,77 \pm 3,15	12,61 \pm 0,64
Kaempferol-3-glucósido	47,07 \pm 9,95	47,58 \pm 16,46	15,05 \pm 2,77	44,88 \pm 1,33	66,11 \pm 26,91

Tabla 12. Resultados obtenidos para antocianinas en orujos. Los datos se muestran como el valor medio \pm la desviación estándar en mg equivalentes de pelargonidina / Kg de orujo. N.D.: no detectado.

	ORUJOS				
	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH
Delfinidin-3-glucósido	23,56 \pm 9,36	6,68 \pm 1,19	8,83 \pm 3,08	9,74 \pm 2,48	10,75 \pm 3,13
Cianidin-3-glucósido	13,72 \pm 1,64	N.D.	N.D.	N.D.	4,59 \pm 0,01
Petunidin-3-glucósido	43,74 \pm 18,67	16,06 \pm 5,43	12,58 \pm 6,13	23,98 \pm 0,97	21,13 \pm 9,53
Peonidin-3-glucósido	45,62 \pm 15,00	89,74 \pm 7,34	26,80 \pm 11,40	43,54 \pm 9,65	59,41 \pm 22,11
Malvidin-3-glucósido	368,85 \pm 91,85	708,27 \pm 178,27	227,96 \pm 58,91	518,91 \pm 47,13	318,34 \pm 93,09
Malvidin-3-(6-O-acetil)-glucósido	86,75 \pm 4,72	119,87 \pm 34,14	171,63 \pm 30,06	420,84 \pm 19,51	210,63 \pm 19,12
Malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (cis)	93,85 \pm 14,09	76,00 \pm 7,46	29,36 \pm 11,61	91,46 \pm 15,44	94,05 \pm 33,58
Malvidin-3-(6-O-cafeoil)-glucósido	44,44 \pm 9,81	37,39 \pm 12,01	14,16 \pm 5,53	34,39 \pm 5,42	60,69 \pm 18,07
Petunidin-3-(6-O-p-cumaroil)glucósido	109,28 \pm 28,99	46,92 \pm 9,65	14,34 \pm 3,51	45,40 \pm 12,43	130,81 \pm 49,95
Malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (trans)	478,90 \pm 87,85	553,36 \pm 208,12	82,00 \pm 27,05	455,91 \pm 60,89	900,39 \pm 223,60

Según lo comentado, las distintas variedades de orujos se diferencian tanto en su contenido en flavonoles como en su contenido en antocianinas. A partir de un análisis de discriminantes se puede ver como el contenido en estas familias de compuestos, de las distintas variedades de orujos, es tan particular que se pueden establecer funciones que clasifican el 100% de los datos considerados (28 muestras) por variedad. Es decir, el contenido en estas familias de compuestos resulta ser un factor distintivo que permite clasificar las distintas variedades de orujos en grupos diferenciados, como queda representado en la *Figura 11*.

4. Caracterización del contenido polifenólico

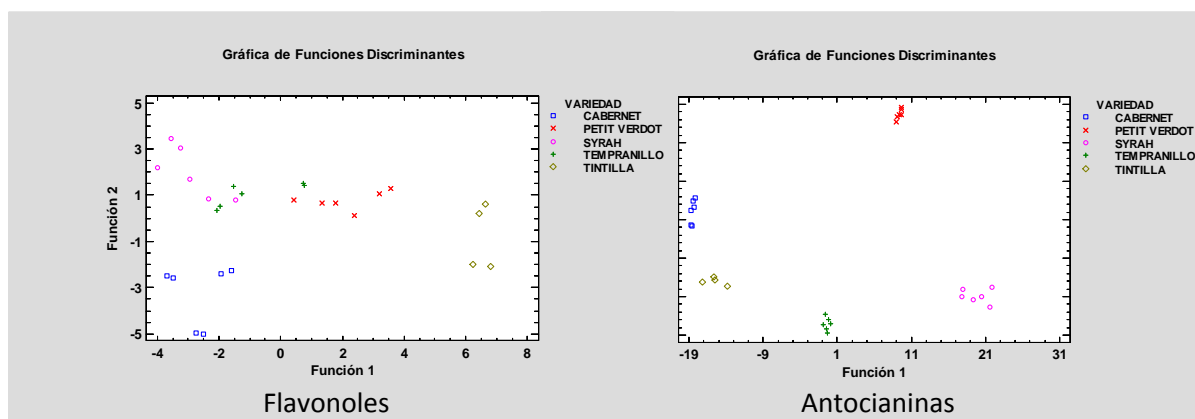


Figura 11. Análisis discriminante para flavonoles y antocianinas individuales en orujos.

En base a los compuestos identificados y los resultados obtenidos, se han calculado los porcentajes relativos de cada una de las familias de polifenoles estudiadas en las muestras de uvas de aclareo y orujos. Dichos porcentajes se muestran en la figura contigua.

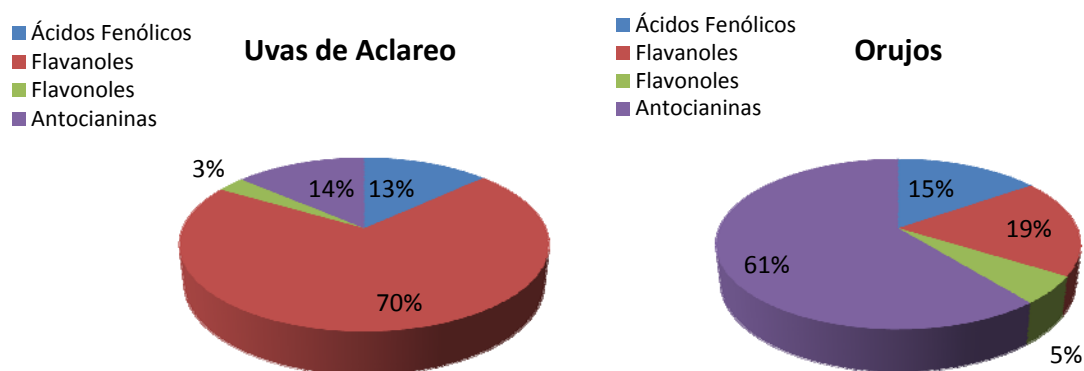


Figura 12. Representación gráfica de los porcentajes medios obtenidos, para las distintas familias de polifenoles, en las muestras de subproductos estudiadas.

4.4.3. Conclusiones.

- Se han identificado 5 flavonoles y 10 antocianinas. Tanto para la uva de aclareo como para los orujos los flavonoles mayoritarios encontrados son los derivados de miricetina y el kaempferol-3-glucósido. En el caso de las antocianinas, la mayoritaria en todos los casos fue la malvidin-3-glucósido seguida de sus derivados cumaroil y acetil glucósido.
- En la uva de aclareo se encontraron de 48,5 – 58,6 y de 20,29 – 352,1 mg / kg de uva de aclareo de flavonoles y antocianinas totales respectivamente. Se hallaron diferencias para los flavonoles por variedad pero no por el estado de maduración de la uva. La variedad tintilla de Rota fue la que mostró mayor contenido diferenciándose del resto de variedades. Para las antocianinas no se establecieron diferenciaciones por variedad pero sí con respecto al estado de maduración. Estados de maduración a partir de 0,6 mostraron los mejores resultados.
- Las cantidades de flavonoles y antocianinas halladas en los orujos fueron de 68,9 – 138,7 y 587,7- 1807,7 mg / Kg de orujo respectivamente. Tanto para el caso de los flavonoles como para las antocianinas se encuentran diferencias en el contenido con respecto a la variedad del orujo pero no con respecto al año de vendimia. El contenido en flavonoles y antocianinas es tan particular para cada variedad de orujo, que se pueden establecer funciones que clasifican el 100% de los datos estudiados. Para ambos tipos de compuestos las variedades tintilla de Rota, syrah y petit verdot se muestran como las de mayor contenido. La variedad cabernet sauvignon destaca, en ambos casos, por su bajo contenido tanto de flavonoles como de antocianinas.

4.5. CONCLUSIONES GENERALES.

- Se han realizados medidas generales del contenido total en polifenoles, antocianos y taninos. Por otro lado, se ha logrado identificar y cuantificar el contenido de un total de 24 polifenoles individuales.
- Para la uva de aclareo se han obtenido cantidades totales de polifenoles de 9,65 – 12,8 mg / g de uva de aclareo, expresados como equivalentes de ácido gálico. De manera promediada, y atendiendo a la suma total de los polifenoles identificados, se ha obtenido que el 13,2% corresponde a ácidos fenólicos, el 70,2% a flavanoles, el 2,9% han sido flavonoles y el 13,7% antocianinas. En base a los resultados obtenidos se ha concluido que es el estado exacto de maduración de la uva de aclareo el factor que más determina su contenido polifenólico, independientemente de la variedad de uva. Aunque toda la uva analizada se recogió próxima al estado de envero, momento que diversos autores consideran como el más adecuado para realizar el aclareo²⁹, el estado de maduración de la uva muestreada no era exactamente el mismo, influyendo este hecho notablemente en los resultados. Una maduración tecnológica próxima a 0,2 da los mejores resultados para ácidos fenólicos y flavanoles, mientras que cuando está por encima de 0,6 se obtienen los mejores resultados para antocianinas. Por su parte, el contenido en flavonoles no se ve significativamente afectado por el estado exacto de maduración. Estimamos como punto óptimo un estado de maduración de la uva de aclareo próxima a 0,5 (baumé/acidez total), a fin de obtener una situación de compromiso que proporcione cantidades a considerar de todas las familias de polifenoles.

²⁹ Puertas, B. et al., *Libro de Actas del X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, 2003.

- En el caso de los orujos, se obtuvieron cantidades de polifenoles totales de 14,6 – 17,8 mg / g de orujo. En relación a los polifenoles identificados y de forma promediada, aproximadamente el 15,3% corresponde a ácidos fenólicos, el 18,6% flavanoles, el 5,3% son flavonoles y el 60,9% antocianinas. El contenido polifenólico de los orujos no se ve muy influenciado por el año de vendimia, pero puede diferenciarse en función de la variedad de uva, encontrándose importantes diferencias en las cantidades halladas de flavanoles, flavonoles y antocianinas. Se pueden establecer funciones que clasifican el 100% de las distintas variedades de orujos estudiadas en función de su contenido en flavonoles o antocianinas. Las variedades petit verdot y tempranillo mostraron tener los mayores contenidos en flavanoles. Por otro lado, las variedades tintilla de Rota, syrah y petit verdot tuvieron los mayores resultados para flavonoles y antocianinas. Basándonos en todos los resultados obtenidos, podemos concluir que son los orujos de las variedades petit verdot, seguidos de los de syrah y tintilla de Rota los más adecuados para utilizar en cuanto a su composición polifenólica se refiere. Es interesante resaltar que la variedad cabernet sauvignon se diferenció del resto de variedades resultando ser, y con significativa diferencia, la de menor contenido en flavonoles y antocianinas. De esta manera y de forma general, los orujos de la variedad cabernet sauvignon pueden considerarse como los menos aconsejable de utilizar en relación a su composición polifenólica.
- Aunque ambos tipos de subproductos, uvas de aclareo y orujos, presentan una composición polifenólica bastante distintas, los dos tipos de subproductos poseen cantidades suficientes como para que puedan ser utilizados como fuentes para la obtención de este tipo de compuestos.

4.6. BIBLIOGRAFÍA.

- Amico, V., Chillemi, R., Mangiafico, S., Spatafora, C., & Tringali, C. (2008). Polyphenol-enriched fractions from Sicilian grape pomace: HPLC-DAD analysis and antioxidant activity. *Bioresource technology*, 99(13), 5960-5966.
- Buiarelli, F., Coccioli, F., Merolle, M., Jasionowska, R., & Terracciano, A. (2010). Identification of hydroxycinnamic acid-tartaric acid esters in wine by HPLC-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 123(3), 827-833.
- Castillo-Muñoz, N., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2007). Flavonol profiles of Vitis vinifera red grapes and their single-cultivar wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 992-1002.
- Castillo-Muñoz, N., Winterhalter, P., Weber, F., Gómez, M. V., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., & Rrez, I. H. (2010). Structure elucidation of peonidin 3,7-O- β -Diglucoside Isolated from Garnacha Tintorera (Vitis vinifera L.) grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(20), 11105-11111.
- Decendit, A., Waffo-Teguo, P., Richard, T., Krisa, S., Vercauteren, J., Monti, J. -, Deffieux, G., & Méillon, J. -. (2002). Galloylated catechins and stilbene diglucosides in Vitis vinifera cell suspension cultures. *Phytochemistry*, 60(8), 795-798.
- De Freitas, V., & Mateus, N. (2001). Structural features of procyanidin interactions with salivary proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(2), 940-945.
- De Pascual-Teresa, S., Moreno, D. A., & García-Viguera, C. (2010). Flavanols and anthocyanins in cardiovascular health: A review of current evidence. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1679-1703.
- Escribano-Bailón, T., Gutiérrez-Fernández, Y., Rivas-Gonzalo, J. C., & Santos-Buelga, C. (1992). Characterization of procyanidins of Vitis vinifera variety tinta del país grape seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(10), 1794-1799.
- El Gharras, H. (2009). Polyphenols: Food sources, properties and applications - A review. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(12), 2512-2518.
- Fang, F., Li, J., Zhang, P., Tang, K., Wang, W., Pan, Q., & Huang, W. (2008). Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. *Food Research International*, 41(1), 53-60.
- Garrido, J., & Borges, F. (2013). Wine and grape polyphenols - A chemical perspective. *Food Research International*, 54(2), 1844-1858.

- Guerrero, R. F., Liazid, A., Palma, M., Puertas, B., González-Barrio, R., Gil-Izquierdo, A., García-Barroso, C., & Cantos-Villar, E. (2009). Phenolic characterisation of red grapes autochthonous to Andalusia. *Food Chemistry*, 112(4), 949-955.
- He, F., Mu, L., Yan, G., Liang, N., Pan, Q., Wang, J., Reeves, M. J., & Duan, C. (2010). Biosynthesis of anthocyanins and their regulation in colored grapes. *Molecules*, 15(12), 9057-9091.
- Jeffery, D. W., Parker, M., & Smith, P. A. (2008). Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 14(3), 153-161.
- Jing, P., Bomser, J. A., Schwartz, S. J., He, J., Magnuson, B. A., & Giusti, M. M. (2008). Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(20), 9391-9398.
- Kallithraka, S., Salacha, M. I., & Tzourou, I. (2009). Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. *Food Chemistry*, 113(2), 500-505.
- Koponen, J. M., Happonen, A. M., Mattila, P. H., & Törrönen, A. R. (2007). Contents of anthocyanins and ellagitannins in selected foods consumed in Finland. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1612-1619.
- Monagas, M., Garrido, I., Bartolomé, B., & Gómez-Cordovés, C. (2006). Chemical characterization of commercial dietary ingredients from *Vitis vinifera* L. *Analytica Chimica Acta*, 563(1-2 SPEC. ISS.), 401-410.
- Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*. 1ª Ed. España: Mundi-Prensa, 2010.
- Obón, J. M., Díaz-García, M. C., & Castellar, M. R. (2011). Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24(6), 760-771.
- Puertas, B.; Cruz, S.; Serrano, M.J.; Valcárcel, M.C.; García de Luján, A. "Incidencia de la práctica del aclareo de racimos en la concentración de antocianos y taninos y en el color de los vinos de las variedades Cabernet Sauvignon, Merlot, Syrah y Tempranillo". *Libro de Actas del X Congresso Brasileiro de Viticultura e Enologia*, 2003.
- Quiñones, M., Miguel, M., & Aleixandre, A. (2012). [The polyphenols, naturally occurring compounds with beneficial effects on cardiovascular disease]. *Nutrición hospitalaria : organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral*, 27(1), 76-89.
- Rasmussen, S. E., Frederiksen, H., Krogholm, K. S., & Poulsen, L. (2005). Dietary proanthocyanidins: Occurrence, dietary intake, bioavailability, and protection against cardiovascular disease. *Molecular Nutrition and Food Research*, 49(2), 159-174.

4. Caracterización del contenido polifenólico

- Schwarz, M., Rodríguez, M. C., Guillén, D. A., & Barroso, C. G. (2009). Development and validation of UPLC for the determination of phenolic compounds and furanic derivatives in Brandy de Jerez. *Journal of Separation Science*, 32(11), 1782-1790.
- The Australian Wine Research Institute. AWRI standard methods, 2009. URL: https://www.awri.com.au/information_services/fact_sheets/ [Consulta: septiembre de 2012]
- Vanzo, A., Cecotti, R., Vrhovsek, U., Torres, A. M., Mattivi, F., & Passamonti, S. (2007). The fate of trans-caftaric acid administered into the rat stomach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(4), 1604-1611.

CAPÍTULO 5. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EN ÁCIDOS ORGÁNICOS.

5.1. INTRODUCCIÓN.

La uva y el vino poseen una serie de ácidos orgánicos de gran importancia, ya que su contenido tiene un relevante impacto en propiedades como el color, sabor y estabilidad del vino^{1,2}. Estos ácidos pueden afectar, al modificar el pH, al metabolismo de los compuestos fenólicos y actúan como precursores de algunos compuestos³. Se puede hacer una primera clasificación de estos ácidos considerando aquellos que provienen directamente de la uva y aquellos que se generan como consecuencia de la acción de microorganismos. Los ácidos más abundantes en la uva son el ácido tartárico y el ácido málico, aunque la uva también contiene pequeñas cantidades de otros ácidos como es el caso del ácido cítrico⁴. Entre los generados por la acción de microorganismos podemos encontrar el ácido láctico, succínico y acético, entre otros. Estos ácidos son usados como un indicador de alteraciones microbiológicas⁵.

El ácido tartárico es el más importante en la uva y el vino, siendo éste el ácido característico de la vid, ya que aunque el ácido tartárico puede encontrarse en otros vegetales, sólo el fruto de la vid lo contiene en cantidades importantes. Su contenido en la uva dependerá de la variedad y condiciones ambientales de cultivo pudiendo ir de 3 – 9 g /L en mosto⁶. Es el ácido más fuerte de los presentes en la uva y el principal responsable de su pH. Por su parte, la presencia de ácido málico está muy extendida en el reino vegetal. Es el segundo ácido en abundancia en uva. Los ácidos tartárico y málico representan del 70 – 90% de la acidez total de la uva⁷. El ácido cítrico está

¹ Mato, I. et al., *Food Res. Int.*, 2005, **38**, 1175-1188.

² Rovio, S. et al., *Food Chem.*, 2011, **124**, 1194-1200.

³ Flores, P. et al., *Food Chem.*, 2012, **132**, 1049-1054.

⁴ Jancárová, I. et al., *Central European Journal of Chemistry*, 2013, **11**, 1575-1582.

⁵ Medina-Plaza, C. et al., *Anal. Chim. Acta*, 2015, **853**, 572-578.

⁶ Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*, 1ª ed., 2010.

⁷ Preiner, D. et al., *J. Food Compos. Anal.*, 2013, **32**, 162-168.

5. Caracterización del contenido en ácidos orgánicos

también presente en la uva pero su concentración es relativamente baja en comparación con los dos anteriores⁸.

El contenido de ácido tartárico en uva permanece relativamente estable durante la maduración y apenas depende de las condiciones climáticas del proceso. Esta singularidad constituye un hecho de gran interés enológico. Por un lado, el ácido tartárico puede utilizarse como biomarcador para caracterizar la uva⁹. Por otro lado, que el contenido en ácido tartárico apenas cambie durante la maduración de la uva mientras que el de ácido málico desciende con la maduración, hace que se vayan obteniendo distintas relaciones de estos ácidos durante el proceso de maduración. El ratio entre estos ácidos es usado con frecuencia para determinar el momento de vendimia¹⁰.

Desde un punto de vista industrial, el ácido tartárico tiene una gran importancia enológica ya que es utilizado para disminuir la acidez de los vinos. De forma general, los ácidos cítrico, málico y tartárico tienen diversas aplicaciones en la industria alimentaria: se utilizan para preservar los alimentos debido a que muestran una acción antimicrobial inhibiendo el crecimiento de varios microorganismos patógenos¹¹ y también son utilizados como acidulantes para ajustar el pH y/o como agente saborizante¹².

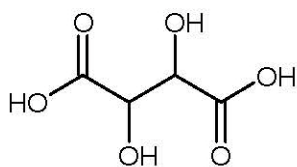
⁸ Nielsen, J. C. and Richelieu, M., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, **65**, 740-745.

⁹ Liu, H. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2006, **86**, 1526-1536.

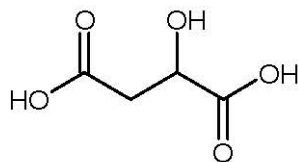
¹⁰ Palma, M. and G. Barroso, C., *Anal. Chim. Acta*, 2002, **458**, 119-130.

¹¹ Singh, J. P. *et al.*, *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 2014, **25**, 269-273.

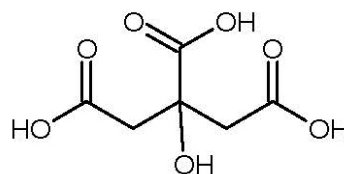
¹² Berry, S. K., *Journal of Food Science and Technology*, 2001, **38**, 93-104.



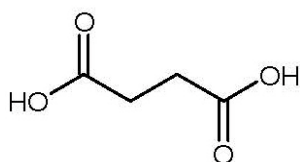
Ácidotartárico



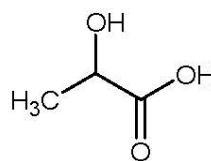
Ácido málico



Ácido cítrico



Ácido succínico



Ácido láctico

Estructuras ácidos orgánicos.

5.2. CARACTERIZACIÓN.

5.2.1. Materiales y métodos.

5.2.1.1. Reactivos y disolventes.

Para este estudio se utilizó etanol de grado analítico, ácido tartárico y ácido cítrico suministrados por Panreac (Barcelona, Spain). El ácido málico, ácido succínico, AEDT y Bis-tris fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, Mo, USA). También se utilizó ácido acético y ácido trifluoroacético de Merck (Darmstadt, Germany) y ácido láctico de

Fluka Chemie AG (Buchs, Switzerland). Se empleó agua ultrapura obtenida a partir de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA).

5.2.1.2. Metodología.

La metodología empleada consistió en la inyección directa, previa filtración de los extractos de subproductos (membrana con tamaño de poro 0,45 μm), en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un detector conductimétrico, siguiendo la metodología descrita por Gillén et al.¹³. El equipo estaba compuesto por dos bombas modelo 2150 y un horno para la columna modelo 2155 de LKB (Pharmacia, Sweden); un inyector automático modelo 717 (Waters, Milford, MA); un detector conductimétrico Conductomonitor III (Milton Roy, LDC, FL); y fue empleado el software Empower (Waters, Milford, MA). La separación cromatográfica fue realizada a través de una columna de exclusión iónica Rezex ROA-Organic Acid H+ (8%), 300 x 7.8 mm (Phenomenex, Germany). La columna se mantuvo a 60 °C y se inyectaron 40 μl de muestra utilizando como fase móvil una disolución de trifluoroacético (TFA) 2,5 mM a un flujo de 0,4 ml/min. Con la finalidad de aumentar la sensibilidad de la detección, se empleó un segundo eluyente añadido post-columna a un flujo de 0,4 ml/min. Esta segundo eluyente consistió en una solución de TFA 2,5 mM, un tampón Bis-Tris a 20 mM y AEDT 0,1 mM.

5.2.1.3. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un análisis estadístico descriptivo a cada una de las variables. Se llevo a cabo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA) de un

¹³ Guillén, D. A. et al., *Analisis*, 1998, **26**, 186-189.

factor, considerándose como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

5.2.2. Resultados y discusión.

Se identificaron y cuantificaron un total de seis ácidos orgánicos en las muestras analizadas. Estos fueron los ácidos: cítrico, tartárico, málico, succínico, láctico y acético. La cuantificación de estos ácido se realizó a partir de sus correspondientes rectas de calibrado, que fueron realizada disolviendo los patrones en un mezcla EtOH – H₂O (1:1) y construidas a partir de seis puntos de concentración realizados por duplicado. Para todos los ácidos se utilizó el área de su correspondiente pico cromatográfico para su cuantificación, a excepción del ácido cítrico para el que se utilizó la altura del pico. En la *Tabla 13* se muestran los intervalos de concentración utilizados para la elaboración de los calibrados, así como, a modo de referencia, los datos medios de los R^2 , límites de detección y cuantificación obtenidos a partir de las rectas realizadas en los distintos años de muestreo.

Tabla 13. Datos medios de las rectas de calibrado realizadas para el estudio de los ácidos orgánicos de los subproductos analizados. Concentraciones en ppm.

PATRÓN	RANGO CONCENTRACIÓN	R^2	LOD	LOQ
Ácido cítrico	5 - 100	0,9985	1,343	4,476
Ácido tartárico	10 - 400	0,9994	1,621	5,405
Ácido málico	15 - 600	0,9996	3,270	10,901
Ácido succínico	2,5 - 50	0,9984	0,561	1,869
Ácido láctico	2,5 - 50	0,9976	1,185	3,952
Ácido acético	2,5 - 50	0,9994	0,704	2,345

5. Caracterización del contenido en ácidos orgánicos

A continuación se muestra el perfil cromatográfico obtenido para las distintas muestras estudiadas (*Figura 13*) a partir de la cromatografía de exclusión iónica con detección conductimétrica.

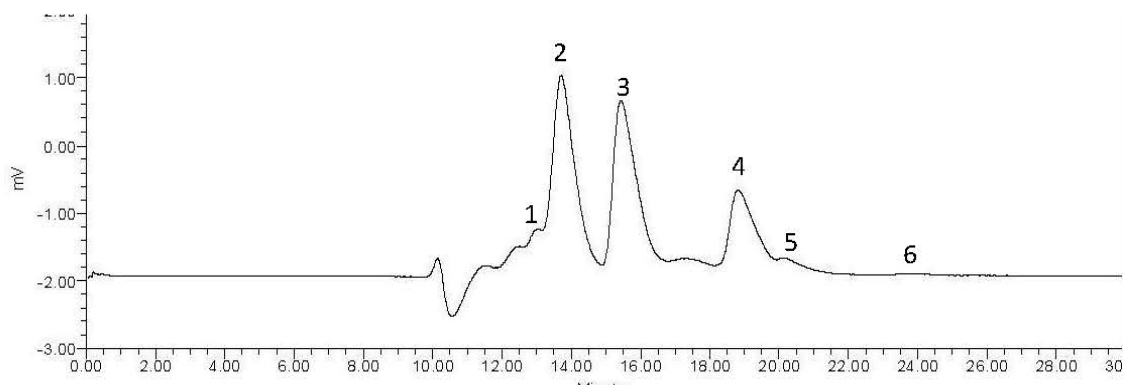


Figura 13. Ejemplo del perfil cromatográfico obtenido en la determinación de ácidos orgánicos en los extractos de subproductos analizados.

✓ Uva de aclareo.

Se han encontrados grandes cantidades de ácidos orgánicos en todas las muestras de uvas de aclareo. El rango medio de concentración obtenido para la suma de todos los ácidos determinados va desde 9,6 a 24,4 mg / g de uva de aclareo. En las uvas de aclareo sólo se han encontrado ácido tartárico, málico y cítrico, lo que indica la no presencia de actividad microbiana. Como era de esperarse, los ácidos málico y tartárico aparecen a concentración mucho mayor que el cítrico, si bien para la mayoría de las muestras el contenido en ácido málico supera al de tartárico. Este hecho es normal sólo en el periodo de envero, donde el ácido málico se encuentra a su máxima concentración¹⁴. Las cantidades medias obtenidas de ácido cítrico son de 0,4 mg / g de

¹⁴ Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*, 1ª ed., 2010.

uva de aclareo y las de tartárico y málico son de 6,5 y 10,0 mg / g respectivamente (Figura 14). En la Tabla 14 se muestran todos los resultados obtenidos en este estudio.

ÁC. ORGÁNICOS EN UVA DE ACLAREO

■ ÁC. CÍTRICO ■ ÁC. TARTÁRICO ■ ÁC. MÁLICO

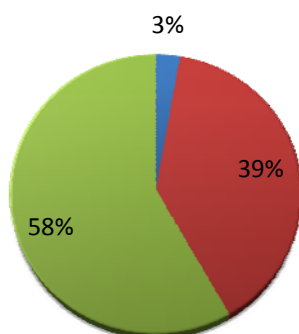


Figura 14. Composición media de la uva de aclareo analizada.

Tabla 14. Resultados de la composición en ácidos orgánicos obtenidos para la uva de aclareo estudiada. Los datos se exponen como el resultado medio \pm su desviación estándar en mg / g de uva de aclareo. N.D.: no detectado.

	UVA ACLAREO							
	TEMPRANILLO VEND'12	TEMPRANILLO VEND'13	TINTILLA DE ROTA VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'13	PETIT VERDOT VEND'12	SYRAH VEND'12	SYRAH VEND'13
Ác. cítrico	0,26 \pm 0,00	0,31 \pm 0,01	0,70 \pm 0,02	0,39 \pm 0,02	0,48 \pm 0,01	0,59 \pm 0,01	0,38 \pm 0,00	0,46 \pm 0,04
Ác. tartárico	5,36 \pm 0,23	6,13 \pm 0,12	9,14 \pm 0,45	4,32 \pm 0,12	9,23 \pm 0,35	5,36 \pm 0,25	3,75 \pm 0,39	9,04 \pm 0,74
Ác. málico	4,03 \pm 0,13	10,30 \pm 0,10	11,98 \pm 0,25	6,17 \pm 0,15	13,76 \pm 0,65	11,69 \pm 0,25	7,49 \pm 0,33	14,94 \pm 1,20
Ác. succínico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ác. láctico	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
Ác. acético	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.

No se encuentran diferencias significativas entre cada uno de los ácidos determinados por variedades de uva analizadas, a excepción de para el ácido cítrico, cuyo contenido es significativamente mayor para las variedades tintilla de Rota y petit verdot. Al considerar la suma de todos los ácidos determinados tampoco se encuentran diferencias entre las distintas variedades con significancia estadística. Si se comparan los datos en base a la madurez tecnológica de la uva de aclareo, para todos los ácidos aparecen diferencias significativas. Como era de esperarse a menor madurez, mayor contenido en ácidos. La variabilidad del contenido en ácidos con la maduración se cumple incluso para el ácido tartárico. A priori puede parecer una contradicción lo obtenido, ya que habíamos comentado en la introducción de este capítulo que la concentración del ácido tartárico permanece prácticamente estable durante el proceso de maduración. Sin embargo no resulta así al ser muestras correspondientes al periodo de envero. Durante el periodo de envero se producen grandes variaciones en el contenido en ácido tartárico y málico según hemos podido contrastar en la literatura consultada¹⁵. Posteriormente la concentración de tartárico permanece relativamente estable y la de málico sigue fluctuando hasta la vendimia. Por consiguiente, según los resultados obtenidos, es la madurez exacta de la uva de aclareo la que determinará su contenido en ácidos orgánicos, al igual que ocurría con los polifenoles, siendo un factor mucho más influyente que la variedad de uva.

¹⁵ Jancárová, I. et al., *Central European Journal of Chemistry*, 2013, **11**, 1575-1582.

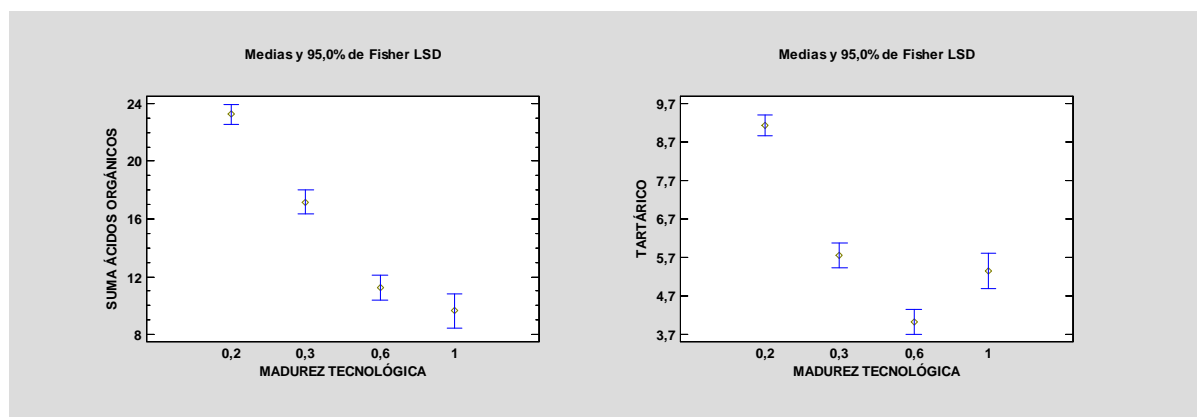


Figura 15. Gráficos de medias y test LSD de Fisher para la suma de todos los ácidos orgánicos determinados y para el ácido tartárico por madurez tecnológica.

✓ Orujos.

En el caso de los orujos se han encontrado cantidades medias de ácidos orgánicos que van desde 8,0 – 8,9 mg / g de orujo. Aunque estas cantidades son más pequeñas a las obtenidas para la uva de aclareo, no dejan de ser cantidades importantes. En los orujos, además de ácido tartárico, málico y cítrico, se han hallado ácido succínico, málico y acético en todas las muestras. El ácido mayoritario encontrado en los orujos es el ácido tartárico. Prácticamente la mitad del contenido determinado de ácidos corresponde al ácido tartárico. A continuación le siguen en cantidad el ácido málico y succínico. Los ácidos cítrico, láctico y acético aparecen en cantidades minoritarias. Mostramos los resultados medios obtenidos en la *Tabla 14* y los porcentajes medios de cada ácido en la *Figura 16*.

5. Caracterización del contenido en ácidos orgánicos

Tabla 14. Contenido en ácidos orgánicos de los orujos por variedad. Los resultados se muestran como el valor medio \pm su desviación estándar en mg del ácido / g de orujo.

	ORUJOS				
	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH
Ácido cítrico	0,47 \pm 0,03	0,47 \pm 0,02	0,48 \pm 0,11	0,40 \pm 0,04	0,41 \pm 0,08
Ácido tartárico	4,99 \pm 0,92	5,34 \pm 1,56	4,00 \pm 0,48	4,47 \pm 1,44	4,77 \pm 1,71
Ácido málico	1,79 \pm 0,15	1,33 \pm 0,08	2,17 \pm 0,68	1,83 \pm 0,45	1,40 \pm 0,33
Ácido succínico	1,03 \pm 0,14	1,05 \pm 0,05	1,24 \pm 0,28	1,38 \pm 0,33	0,86 \pm 0,15
Ácido láctico	0,31 \pm 0,04	0,29 \pm 0,11	0,36 \pm 0,11	0,20 \pm 0,01	0,25 \pm 0,03
Ácido acético	0,29 \pm 0,08	0,29 \pm 0,04	0,33 \pm 0,12	0,26 \pm 0,06	0,29 \pm 0,05

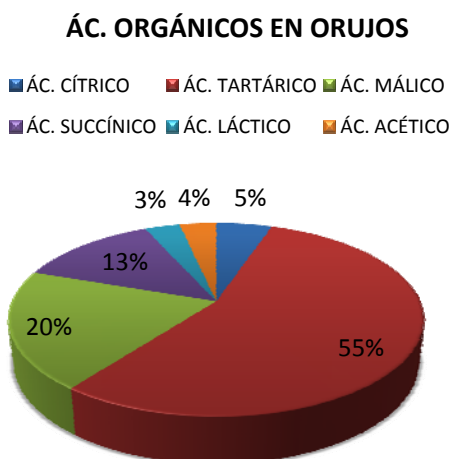


Figura 16. Composición media de los orujos estudiados.

Se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en el contenido de ácidos orgánicos de los orujos de las distintas vendimias, poniéndose de manifiesto la influencia de las particularidades medioambientales de cada añada en la composición ácida final de los subproductos. El coeficiente de variación medio calculado para los ácidos determinados ha sido de un 18,71%.

Por otro lado, en cuanto a la variedad de orujo, sólo se han establecido diferencias significativas entre el contenido en ácido málico y succínico de las distintas variedades. Para ambos casos las variedades petit verdot y cabernet sauvignon mostraron los mayores contenidos. Cuando se estudia la suma de todos los ácidos por variedad, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las distintas variedades (*Figura 17*).

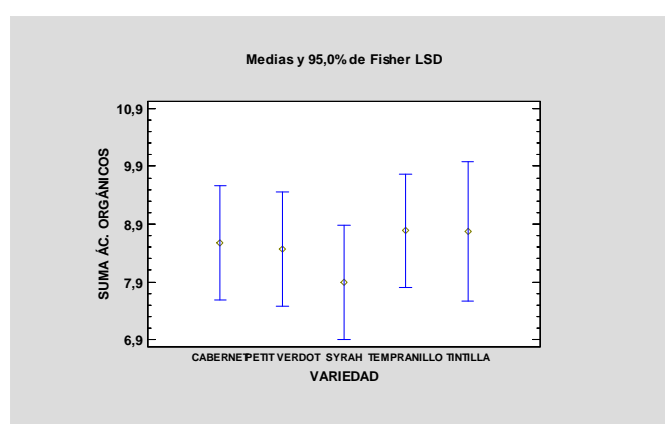


Figura 17. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para el contenido total de ácidos orgánicos estudiados por variedad de orujo.

5.2.3. Conclusiones.

- Se han identificado un total de seis ácidos orgánicos en las muestras estudiadas.
- La uva de aclareo ha mostrado tener una gran cantidad de ácidos orgánicos con un contenido medio de 16,9 mg de ácidos / g de uva de aclareo. En la uva de aclareo sólo se han encontrado ácido tartárico, málico y cítrico. El ácido málico es el mayoritario en este tipo de muestras constituyendo una media del 58% del total, mientras que el

5. Caracterización del contenido en ácidos orgánicos

tartárico y cítrico están en un porcentaje del 39% y 3 % respectivamente. No se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre las distintas variedades de uva, pero si existen con respecto al estado exacto de maduración de la uva. Como es de esperar, cuanto menor es la maduración, mayor contenido en ácidos, fundamentalmente en ácido málico.

- Los orujos también muestran un importante contenido en ácidos orgánicos, con un valor medio de 8,5 mg / g de orujos. En los orujos se encuentra una gran variabilidad de ácidos orgánicos, hallándose además de ácido tartárico, málico y cítrico, ácido succínico, láctico y acético. Más de la mitad del contenido determinado corresponde al ácido tartárico. Aproximadamente el 33 % restante son ácido málico y succínico, mientras que el resto de ácidos apenas suman el 12 % del total. Se han establecido diferencias por año de vendimia. No se han podido establecer diferenciaciones con respecto al contenido total por variedad. Sería igual utilizar una u otra variedad a no ser que se tenga un particular interés por el ácido málico, en cuyo caso sería aconsejable utilizar la variedad petit verdot o cabernet sauvignon.
- Se concluye, entonces, que ambos tipos de subproductos poseen cantidades importantes de ácidos orgánicos. En el caso de los ácidos orgánicos la variedad no es un factor que habría de ser considerado a la hora de elegir ninguno de los subproductos. Si resulta de especial interés el ácido málico, la uva de aclareo sería la mejor elección. Si se busca una mayor variabilidad en el contenido, sería conveniente utilizar orujos.

5.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Berry, S. K. (2001). Role of acidulants in food industry. *Journal of Food Science and Technology*, 38(2), 93-104.
- Flores, P., Hellín, P., & Fenoll, J. (2012). Determination of organic acids in fruits and vegetables by liquid chromatography with tandem-mass spectrometry. *Food Chemistry*, 132(2), 1049-1054.
- Guillén, D. A., Barroso, C. G., Zorro, L., Carrascal, V., & Pérez-Bustamante, J. A. (1998). Organic acids analysis in 'Brandy de Jerez' by ion-exclusion chromatography, 'post-column' buffering and conductimetric detection. *Analisis*, 26(4), 186-189.
- Jancárová, I., Jancár, L., Náplavová, A., & Kubán, V. (2013). Changes of organic acids and phenolic compounds contents in grapevine berries during their ripening. *Central European Journal of Chemistry*, 11(10), 1575-1582.
- Liu, H., Wu, B., Fan, P., Li, S., & Li, L. (2006). Sugar and acid concentrations in 98 grape cultivars analyzed by principal component analysis. *Journal of the science of food and agriculture*, 86(10), 1526-1536.
- Mato, I., Suárez-Luque, S., & Huidobro, J. F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175-1188.
- Medina-Plaza, C., García-Cabezón, C., García-Hernández, C., Bramorski, C., Blanco-Val, Y., Martín-Pedrosa, F., Kawai, T., de Saja, J. A., & Rodríguez-Méndez, M. L. (2015). Analysis of organic acids and phenols of interest in the wine industry using Langmuir-Blodgett films based on functionalized nanoparticles. *Analytica Chimica Acta*, 853(1), 572-578.
- Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*. 1ª Ed. España: Mundi-Prensa, 2010.
- Nielsen, J. C., & Richelieu, M. (1999). Control of flavor development in wine during and after malolactic fermentation by *Oenococcus oeni*. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(2), 740-745.
- Palma, M., & Barroso, C. G. (2002). Ultrasound-assisted extraction and determination of tartaric and malic acids from grapes and winemaking by-products. *Analytica Chimica Acta*, 458(1), 119-130.
- Preiner, D., Tupajic, P., Karoglan Kontic, J., Andabaka, T., Markovic, Z., & Maletic, E. (2013). Organic acids profiles of the most important Dalmatian native grapevine (*V. vinifera* L.) cultivars. *Journal of Food Composition and Analysis*, 32(2), 162-168.
- Rovio, S., Sirén, K., & Sirén, H. (2011). Application of capillary electrophoresis to determine metal cations, anions, organic acids, and carbohydrates in some Pinot Noir red wines. *Food Chemistry*, 124(3), 1194-1200.
- Singh, J. P., Singh, S. K., Chandel, R., Pandey, G., Prakash, A., & Chidambaram, R. (2014). Optimisation of common acidulant (Fruitaric Acids) to enhance organoleptic quality and shelf life of fruit juices. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(1), 269-273.

CAPÍTULO 6. CARACTERIZACIÓN DEL CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS.

6.1. INTRODUCCIÓN.

Los aminoácidos son moléculas orgánicas que contienen un grupo amino y un grupo carboxilo, con una cadena lateral R que caracteriza cada aminoácido. En la naturaleza existen cientos de aminoácidos pero los más frecuentes y de mayor interés son aquellos que forman parte de las proteínas. Las proteínas están compuestas por 20 aminoácidos distintos, todos α -aminoácidos porque, a excepción de la prolina, poseen un grupo amino primario y un ácido carboxílico sustituyente en el mismo átomo de carbono¹.

En la uva, el contenido en aminoácidos representa del 30 – 40% del nitrógeno total². Los aminoácidos predominantes en el mosto son la arginina, prolina, el ácido glutámico y la glutamina. La composición en aminoácidos libres de la uva dependerá de las condiciones y prácticas de cultivo^{3,4}, el grado de maduración de la uva⁵, su estado de sanidad y la aplicación de fungicidas⁶. Desde un punto de vista enológico, los aminoácidos tienen importancia por su relación con el aroma final de los vinos^{7,8}. También influyen en el proceso fermentativo ya que constituyen una fuente de nitrógeno para las levaduras^{9,10}. Un insuficiente nivel de nitrógeno puede dar lugar a paradas fermentativas y a un aumento en el contenido de indeseables tioles, mientras

¹ Voet, D. and Voet, J. G. *Bioquímica*, 3ª ed., 2006.

² Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*, 1ª ed., 2010.

³ Gouthu, S. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **135**, 1-8.

⁴ Lee, J. and Steenwerth, K. L., *Food Chem.*, 2011, **127**, 926-933.

⁵ Jogaiah, S. *et al.*, *Int. J. Fruit Sci.*, 2010, **10**, 323-340.

⁶ Oliva, J. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **129**, 1676-1680.

⁷ Garde-Cerdán, T. and Ancín-Azpilicueta, C., *LWT - Food Sci. Technol.*, 2008, **41**, 501-510.

⁸ Hernandez-Orte, P. *et al.*, *Austr. J. Grape Wine Res.*, 2006, **12**, 150-160.

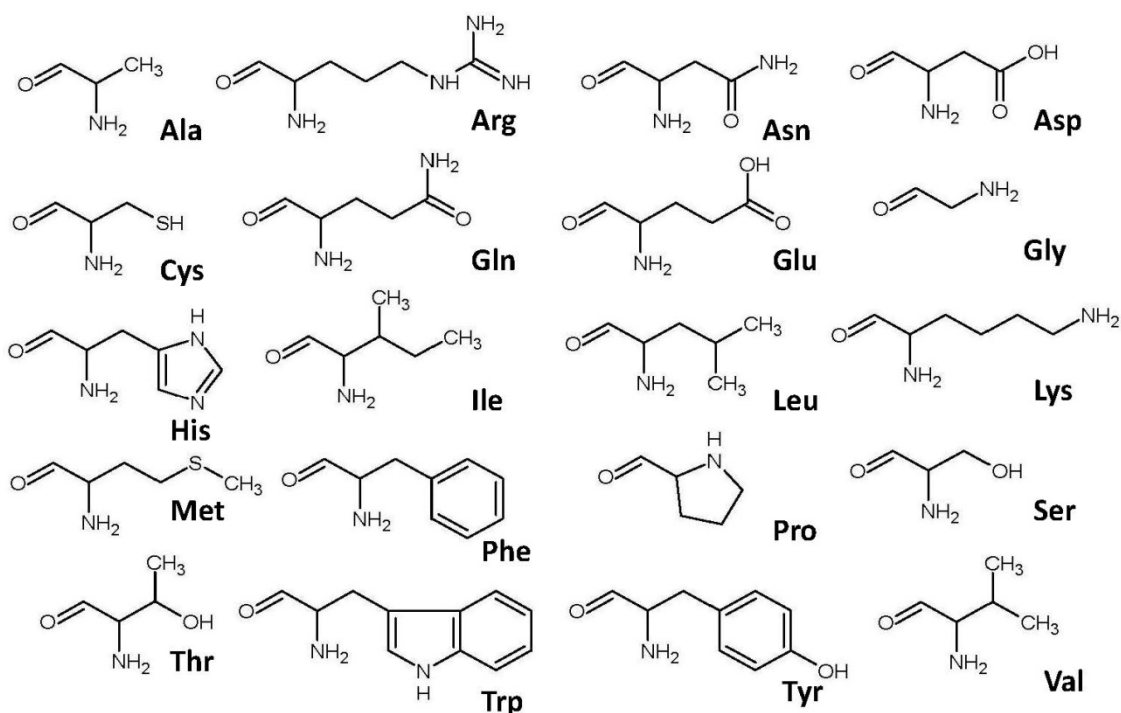
⁹ Mendes-Ferreira, A. *et al.*, *J. Appl. Microbiol.*, 2004, **97**, 540-545.

¹⁰ Garde-Cerdán, T. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **124**, 106-116.

6. Caracterización del contenido en aminoácidos

que un exceso puede generar inestabilidad microbiológica, fermentaciones demasiado vigorosas con el correspondiente aumento de temperatura y aumentar la formación de algunos compuestos como el acetato de etilo o el ácido acético¹¹.

Desde un punto de vista industrial, los aminoácidos tienen una gran importancia para la industria alimentaria, siendo utilizados como complementos nutricionales, aditivos y saborizantes. También son muy utilizados por la industria farmacéutica y cosmética.



Estructura aminoácidos

Ala- alanina, **Arg-** arginina, **Asn** –aspargina, **Asp-** ácido aspártico, **Cys-** cisteína, **Gln-** glutamina, **Glu-** ácido glutámico, **Gly-** glicina, **His-** histidina, **Ile-** isoleucina, **Leu-** leucina, **Lys-** lisina, **Met-** metionina, **Phe-** fenilalanina, **Pro-** prolina, **Ser-** serina, **Thr-** treonina, **Trp-** triptófano, **Tyr-** tirosina, **Val-** valina.

¹¹ Bell, S. and Henschke, P. A., *Austr. J. Grape Wine Res.*, 2005, **11**, 242-295.

6.2. CARACTERIZACIÓN.

6.2.1. Materiales y métodos.

6.2.1.1. Reactivos y disolventes.

Para la determinación de aminoácidos en los subproductos estudiados se utilizó un Kit de reactivos, AccQ•Tag, suministrado por Waters (Milford, Massachusetts, USA). Se utilizó agua ultra-pura obtenida a partir de un sistema Milli-Q de Millipore (Bedford, MA).

6.2.1.2. Metodología.

Se utilizó el método AccQ•Tag y el kit de reactivos de Waters para la derivatización y determinación de los aminoácidos. Este método se basa en una derivatización precolumna con el reactivo AccQ•Fluo (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimidil carbamato o AQC), separación en HPLC con fase reversa y cuantificación por detección de fluorescencia (λ excitación – emisión = 250 – 395 nm). El sistema de HPLC utilizado fue un Waters Alliance 2695, con la columna AccQ•Tag Amino Acid (Nova-Pak C18, 4 μ m, 150 x 3.9 mm) y los eluyentes Waters AccQ•Fluor. El calibrado se realizó con estándares de aminoácidos hidrolizados suministrados en el Kit, que contenía una mezcla de 17 aminoácidos 2,5 mM con excepción de la cisteína que estaba a 1,25 mM.

6.2.1.3. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un análisis estadístico descriptivo a cada una de las variables. Se llevo a cabo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA) de un factor, considerándose como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. En base a los datos obtenidos, se realizó un análisis discriminante a los resultados de orujos. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

6.2.2. Resultados y discusión.

Se han identificado en las muestras objeto de estudio un total de 10 aminoácidos libres: Ser, Arg, Thr, Ala, Pro, Tyr, Val, Ile, Leu y Phe. La cuantificación se realizó a partir de sus correspondientes rectas de calibrado, utilizando los estándares suministrados en el Kit de Waters y siguiendo la metodología indicada. Se realizaron seis puntos por duplicado, y se utilizaron las áreas de los correspondientes picos cromatográfico. Se muestran, en la *Tabla 18*, los datos relativos a los intervalos de concentración de las rectas de calibrado, así como los valores medios obtenidos para R^2 , límites de detección y cuantificación, en los distintos años. En la *Figura 18* se puede observar, como ejemplo, el perfil cromatográfico obtenido en el estudio de los aminoácidos.

Tabla 18. Información relativa a la elaboración de las rectas de calibrado para el estudio de aminoácidos. Los datos de rango de concentración y límites de detección y cuantificación están expresados en nM.

PATRÓN	RANGO CONCENTRACIÓN	R ²	LOD	LOQ
Serina	390,6 - 6250	0,9989	130,8	391,5
Arginina	390,6 - 6250	0,9974	148,8	496,0
Treonina	390,6 - 6250	0,9986	125,1	416,9
Alanina	390,6 - 6250	0,9975	110,8	370,9
Prolina	390,6 - 6250	0,9989	134,3	447,7
Tirosina	390,6 - 6250	0,9971	124,8	415,9
Valina	390,6 - 6250	0,9974	141,8	472,6
Isoleucina	390,6 - 6250	0,9980	102,6	341,9
Leucina	390,6 - 6250	0,9976	112,6	375,5
Fenilalanina	390,6 - 6250	0,9971	124,8	415,9

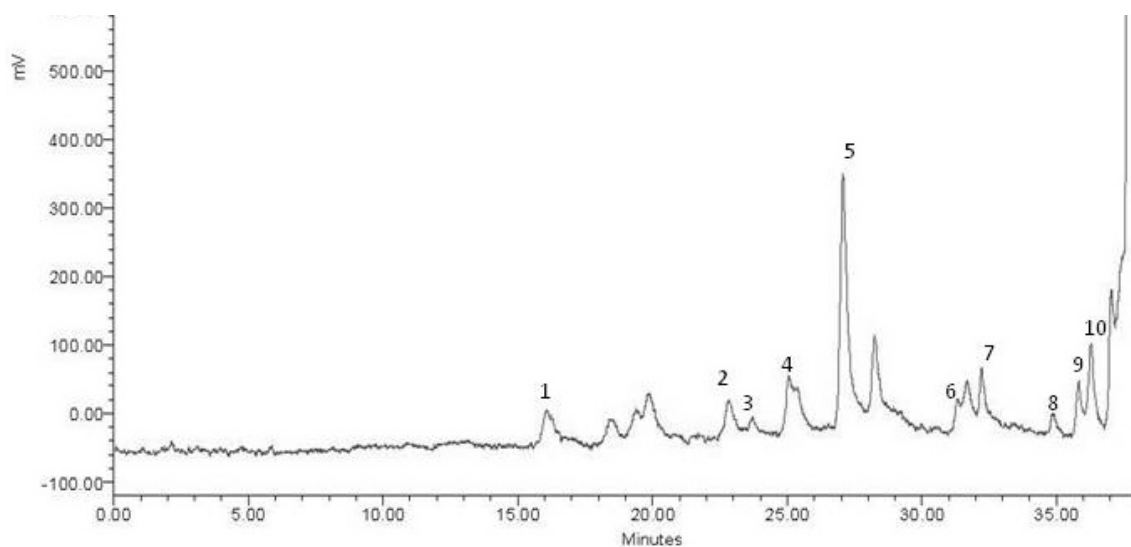


Figura 18. Perfil cromatográfico obtenido para aminoácidos a partir de HPLC con detector de fluorescencia (λ excitación - emisión = 250 – 395 nm). (1) Ser; (2) Arg; (3) Thr; (4) Ala; (5) Pro; (6) Tyr; (7) Val; (8) Ile; (9) Leu; (10) Phe.

✓ Uva de aclareo.

En las uvas de aclareo se han obtenido cantidades medias de aminoácidos que van desde 229,2 a 811,9 mg / Kg de uva de aclareo. De los diez aminoácidos estudiados, algunas muestras no mostraron tener Tyr y en sólo una no se encontró Val. El aminoácido mayoritario en la uva de aclareo ha sido la Arg, con un contenido medio del 68% del total. Ha éste le siguieron la Thr con el 14% y la prolina con un 9% del total (*Figura 19*). El resto de aminoácidos se encontraron de forma minoritaria. En la *Tabla 19* se pueden observar los resultados obtenidos para las distintas muestras.

Si estudiamos los contenidos obtenidos por variedad de uva, se encuentra que para gran parte de los aminoácidos la variedad de uva implica diferencias en el contenido. Si bien para el contenido en Arg, el aminoácido mayoritario, no se han encontrado diferencias significativas por variedad, para los siguientes aminoácidos en cantidad si han aparecido diferencias, como es el caso de la Thr, Pro, Ala y Ser entre otros. La variedad cabernet sauvignon se destaca por su contenido en algunos de estos aminoácidos como es el caso de su contenido en Pro, Ala y Tyr. Si se atiende a la suma de todos los aminoácidos, al contenido total, no se han podido establecer diferencias por variedad de uva.

Si prestamos atención, como en el resto de estudios, a la variable madurez tecnológica de la uva, sólo se establecen diferencias por madurez para los aminoácidos Thr, Val y Leu, ninguno de los mayoritarios. Para estos se obtienen los mayores contenidos a una madurez tecnológica de 0,3 – 0,6. Al considerar la suma total de aminoácidos no se encuentran diferencias entre los distintos estados de maduración. Este hecho viene a indicar que, si bien el contenido en aminoácidos depende del estado de maduración de forma general, como indicábamos en la introducción de este capítulo, en el período de envero, los pequeños cambios en la maduración no resultan ser tan influyentes como ocurre en los contenidos de otros parámetros ya mostrados.

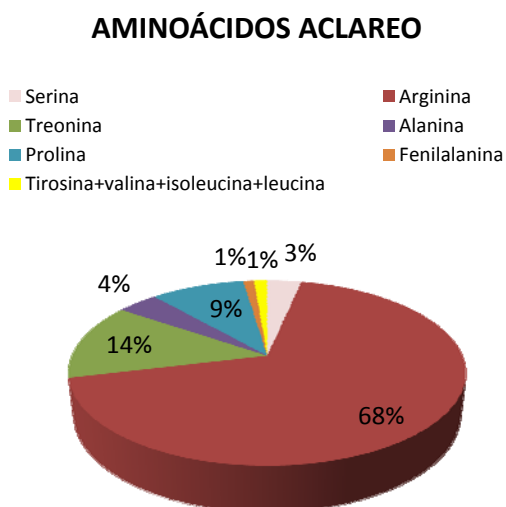


Figura 19. Porcentajes medios de los distintos aminoácidos encontrados en la uva de aclareo.

Tabla 19. Resultados obtenido para cada uno de los aminoácidos estudiados en la uva de aclareo. Los resultados se exponen como el valor medio \pm su desviación estándar en mg / Kg de uva de aclareo. N.D.: no detectado; N.Q.: no cuantificado.

UVA ACLAREO								
	TEMPRANILLO VEND'12	TEMPRANILLO VEND'13	TINTILLA DE ROTA VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'12	CABERNET SAUVIGNON VEND'13	PETIT VERDOT VEND'12	SYRAH VEND'12	SYRAH VEND'13
Serina	16,71 \pm 0,87	39,74 \pm 1,42	8,43 \pm 0,54	12,75 \pm 0,88	15,08 \pm 0,30	9,57 \pm 0,22	13,41 \pm 1,76	15,09 \pm 0,08
Arginina	126,12 \pm 2,41	588,02 \pm 34,55	169,26 \pm 8,12	263,53 \pm 14,23	655,17 \pm 26,41	123,90 \pm 0,09	180,06 \pm 21,40	547,29 \pm 3,14
Treonina	78,05 \pm 4,30	69,47 \pm 3,88	14,95 \pm 0,50	77,17 \pm 3,52	63,30 \pm 0,73	62,41 \pm 0,77	93,19 \pm 8,37	64,32 \pm 0,73
Alanina	25,56 \pm 0,67	46,85 \pm 0,25	0,57 \pm 0,03	18,90 \pm 0,89	15,71 \pm 0,61	13,46 \pm 0,04	10,57 \pm 0,96	24,23 \pm 0,19
Prolina	50,59 \pm 0,60	40,17 \pm 0,62	20,31 \pm 1,06	92,35 \pm 2,37	50,97 \pm 0,43	39,57 \pm 1,32	41,37 \pm 5,03	22,22 \pm 0,14
Tirosina	N.D.	1,36 \pm 0,11	N.D.	2,91 \pm 0,07	2,18 \pm 0,19	N.D.	N.D.	1,17 \pm 0,08
Valina	0,75 \pm 0,04	2,58 \pm 0,00	0,99 \pm 0,01	2,34 \pm 0,12	1,86 \pm 0,14	1,65 \pm 0,06	2,57 \pm 0,14	N.Q.
Isoleucina	0,76 \pm 0,04	1,27 \pm 0,06	1,74 \pm 0,07	3,52 \pm 0,22	0,28 \pm 0,01	0,92 \pm 0,01	1,26 \pm 0,17	0,70 \pm 0,06
Leucina	0,81 \pm 0,01	2,78 \pm 0,08	2,36 \pm 0,08	2,76 \pm 0,17	3,21 \pm 0,00	2,38 \pm 0,05	1,89 \pm 0,17	2,39 \pm 0,16
Fenilalanina	3,19 \pm 0,07	5,5 \pm 0,39	10,6 \pm 0,42	3,48 \pm 0,09	4,18 \pm 0,03	4,91 \pm 0,03	5,02 \pm 0,64	4,47 \pm 0,05

✓ Orujos.

Para los orujos las cantidades medias de aminoácidos totales encontradas van desde 442,9 mg / Kg de orujo, del orujo de tempranillo, a 1007,3 mg / Kg de orujo del de cabernet sauvignon. Hay algunos aminoácidos que no han sido hallados en todos los orujos. Los orujos de tintilla de Rota no han mostrado tener Ile y en los de cabernet sauvignon estaban ausentes la Ile, Leu y val. En el caso particular de los orujos, la Pro resultó ser el aminoácido mayoritario, constituyendo una media del 85% del contenido total. El siguiente en contenido fue la Tyr con un 5% y el resto se encontraron en porcentajes minoritarios. En la *Figura 20* pueden observarse los porcentajes medios de cada aminoácido y en la *Tabla 20* los contenidos de cada una de estos aminoácidos en las distintas muestras. No se han podido establecer diferencias significativas por vendimia en cuanto al contenido total de aminoácidos.

Del estudio de los contenidos por variedad de orujo se obtuvo que, para la mitad de los aminoácidos estudiados, la variedad es un factor determinante en el contenido. Las variedades tempranillo, syrah y tintilla de Rota se diferencian por su mayor contenido en Val, Leu e Ile. En el caso del aminoácido mayoritario, la Pro, la variedad cabernet sauvignon se separa completamente del resto de variedades, demostrando ser la de mayor contenido. Este hecho marca lo obtenido cuando se estudia la suma total de aminoácidos, donde la variedad cabenet sauvgnon vuelve a diferenciarse del resto, mientras que el resto de variedades muestran conenidos similares (*Figura 21*).

AMINOÁCIDOS ORUJOS

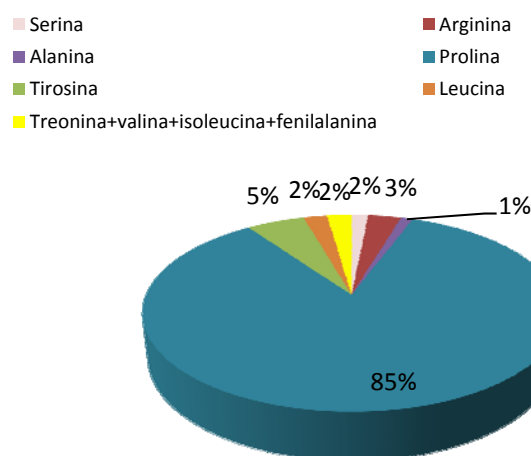


Figura 20. Porcentajes medios de los distintos aminoácidos encontrados en los orujos.

Tabla 20. Resultados obtenido para cada uno de los aminoácidos estudiados en los orujos. Los resultados se presentan como el valor medio \pm su desviación estándar en mg / Kg de orujo. N.D.: no detectado; N.Q.: no cuantificado.

ORUJOS					
	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH
Serina	30,08 \pm 1,89	N.Q.	1,13 \pm 0,01	1,65 \pm 0,25	10,40 \pm 0,24
Arginina	24,16 \pm 1,59	20,92 \pm 0,79	12,44 \pm 0,64	14,89 \pm 0,42	21,46 \pm 0,40
Treonina	3,96 \pm 0,25	3,12 \pm 0,22	2,88 \pm 0,01	0,87 \pm 0,05	7,35 \pm 0,34
Alanina	15,79 \pm 0,05	7,50 \pm 0,22	0,20 \pm 0,02	4,91 \pm 0,19	5,61 \pm 0,51
Prolina	293,68 \pm 17,59	344,19 \pm 66,20	949,07 \pm 14,42	533,25 \pm 21,12	403,21 \pm 26,50
Tirosina	20,97 \pm 1,34	45,61 \pm 10,68	39,64 \pm 4,90	28,53 \pm 2,18	33,11 \pm 1,11
Valina	8,16 \pm 1,14	4,76 \pm 0,43	N.D.	2,63 \pm 0,13	6,07 \pm 0,62
Isoleucina	3,46 \pm 0,57	N.D.	N.D.	0,96 \pm 0,24	0,85 \pm 0,02
Leucina	33,87 \pm 1,33	38,28 \pm 0,76	N.D.	0,91 \pm 0,29	2,13 \pm 0,03
Fenilalanina	8,78 \pm 0,76	4,85 \pm 0,08	1,91 \pm 0,08	3,64 \pm 0,02	5,21 \pm 0,12

6. Caracterización del contenido en aminoácidos

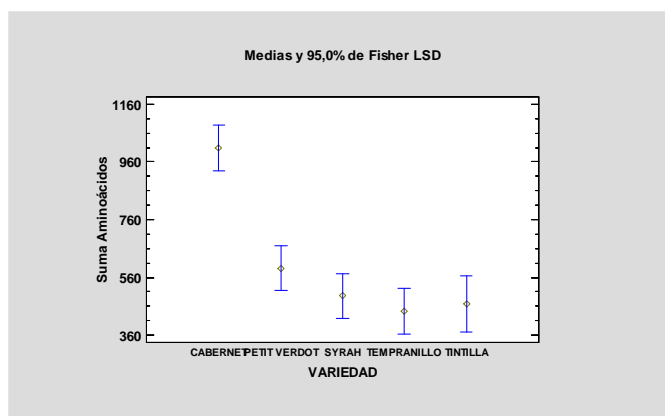


Figura 21. Representación gráfico de medias y test LSD de Fisher para los aminoácidos totales por variedad de uva.

A partir de un análisis de discriminantes, de los datos obtenidos para aminoácidos en las distintas variedades de uvas, se puso de manifiesto que el contenido en aminoácidos para cada variedad de uva es tan singular, que pueden establecerse funciones que clasifican el 100% de los datos obtenidos en función de la variedad. En la *Figura 22* puede observarse como las variedades quedan perfectamente separadas y clasificadas a partir del análisis discriminante.

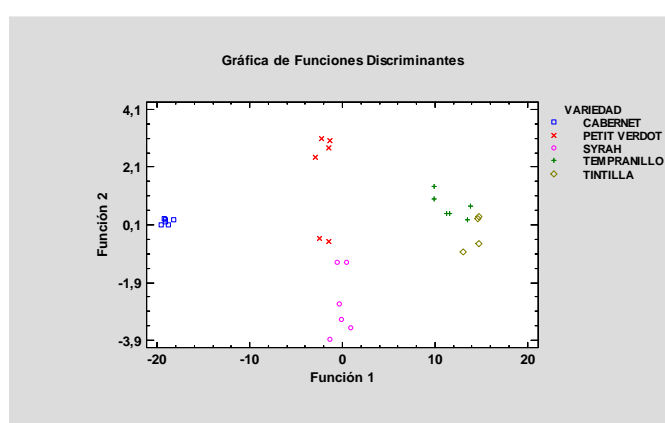


Figura 22. Gráfica del análisis discriminante para los datos de aminoácidos de las distintas muestras de uvas estudiadas.

6.2.3. Conclusiones.

- Se han identificado y cuantificado un total de 10 aminoácidos en las muestras de subproductos estudiadas.
- En las uvas de aclareo se ha encontrado un contenido medio de 520,5 mg de aminoácidos / Kg de uva de aclareo. Los aminoácidos mayoritarios, de forma promediada, son: Arg con un 68%, Thr 14% y Pro 9%. Se encuentran diferencias en los contenidos de la mitad de los aminoácidos individuales por variedad y estado de maduración, pero no aparecen diferencias al considerar la suma total de los aminoácidos de cada muestra.
- Para los orujos, el contenido medio de aminoácidos cuantificados es de 725 mg / Kg de orujo. No aparecen todos los aminoácidos considerados en todas las muestras. La mayor parte del contenido es Pro, 85%. La Tyr se encuentra en un 5% y el resto aparece de manera minoritaria. La variedad cabernet sauvignon se diferencia del resto por su contenido en Pro, mostrando ser la de mayor contenido total por este motivo, aunque es también la que presenta una menor diversidad en aminoácidos, no hallándose en ella aminoácidos como la Ile, Leu o Val. Cada una de las variedades de orujos presenta un contenido en aminoácidos tan diferenciado del resto de variedades que pueden establecerse, a partir de un análisis discriminante, funciones que clasifican el 100% de las muestras por variedad.
- En conclusión, podrían utilizarse cualquiera de los subproductos estudiados para obtener aminoácidos libres, si bien habría de ser seleccionado uno u otro en función de si nos interesa un mayor contenido en Arg o en Pro.

6.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Bell, S. & Henschke, P. A. (2005). Implications of nitrogen nutrition for grapes, fermentation and wine. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 11(3), 242-295.
- Garde-Cerdán, T., & Ancín-Azpilicueta, C. (2008). Effect of the addition of different quantities of amino acids to nitrogen-deficient must on the formation of esters, alcohols, and acids during wine alcoholic fermentation. *LWT - Food Science and Technology*, 41(3), 501-510.
- Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Lorenzo, C., Lara, J. F., Pardo, F., & Salinas, M. R. (2011). Implications of nitrogen compounds during alcoholic fermentation from some grape varieties at different maturation stages and cultivation systems. *Food Chemistry*, 124(1), 106-116.
- Gouthu, S., Skinkis, P. A., Morre, J., Maier, C. S., & Deluc, L. G. (2012). Berry nitrogen status altered by cover cropping: Effects on berry hormone dynamics, growth and amino acid composition of Pinot Noir. *Food Chemistry*, 135(1), 1-8.
- Hernandez-Orte, P., Bely, M., Cacho, J., & Ferreira, V. (2006). Impact of ammonium additions on volatile acidity, ethanol, and aromatic compound production by different *Saccharomyces cerevisiae* strains during fermentation in controlled synthetic media. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 12(2), 150-160.
- Jogaiah, S., Oulkar, D. P., Banerjee, K., Raveendran, P., & Rokade, N. P. (2010). Amino acid profile of 'Thompson Seedless' grapes grafted on different rootstocks at various stages of berry development. *International Journal of Fruit Science*, 10(3), 323-340.
- Lee, J., & Steenwerth, K. L. (2011). Rootstock and vineyard floor management influence on 'Cabernet Sauvignon' grape yeast assimilable nitrogen (YAN). *Food Chemistry*, 127(3), 926-933.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of applied microbiology*, 97(3), 540-545.
- Moreno, J. and Peinado, R. *Química Enológica*. 1ª Ed. España: Mundi-Prensa, 2010.
- Oliva, J., Garde-Cerdán, T., Martínez-Gil, A. M., Rosario Salinas, M., & Barba, A. (2011). Fungicide effects on ammonium and amino acids of Monastrell grapes. *Food Chemistry*, 129(4), 1676-1680.
- Voet, D and Voet, J. G. *Bioquímica*. 3ª Ed., Buenos Aires: Médica Panamericana, 2006.

CAPÍTULO 7. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE

7.1. DESARROLLO DE METODOLOGÍA.

Prácticamente todos los métodos utilizados, para la determinación y cuantificación de los parámetros estudiados en este trabajo, estaban previamente desarrollados y validados. Algunos de ellos se han obtenido a partir de la bibliografía existente, mientras que la mayor parte de estos métodos, han sido desarrollados y publicados en el seno del mismo grupo de investigación donde se ha llevado a cabo esta tesis, el grupo de Investigación Químico-Analítica en Vitivinicultura y Agroalimentación de la Universidad de Cádiz. No obstante, y como comentaremos en el siguiente apartado, la medida de la actividad antioxidante planteaba una problemática que debíamos intentar solventar. En base a la bibliografía consultada, se seleccionó uno de los métodos más utilizados para la determinación de la actividad antioxidante *in-vitro*, la medida a través del radical DPPH. Basándonos en esta metodología, se realizó un estudio con la intención de desarrollar un método simplificado, útil para la medida de la actividad antioxidante de muestras de origen vínico, intentando obviar muchos de los errores que comúnmente se comenten al aplicar esta metodología.

7.1.1. Introducción.

Los compuestos antioxidantes poseen propiedades beneficiosas para la salud, ya que son capaces de proteger los sistemas biológicos contra la acción de los radicales libres, reduciendo la incidencia en diversas enfermedades con las que estos radicales están relacionadas^{1,2,3,4}. Aparte de sus efectos beneficiosos para la salud, los

¹ Briviba, K. *et al.*, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 2814-2818.

² De Gaetano, G. *et al.*, *Sang Thromb. Vaiss.*, 2005, **17**, 47-60.

³ Fernández-Mar, M. I. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **130**, 797-813.

compuestos antioxidantes son utilizados por diversas industrias. En la industria alimentaria, por ejemplo, son empleados para proteger las grasas y otros compuestos de la oxidación, preservando así la calidad del alimento. Por consiguiente, resulta científica y comercialmente interesante poder determinar la actividad antioxidante de compuestos y alimentos en general⁵, y por supuesto, del vino^{6,7,8,9,10} y sus subproductos^{11,12,13,14,15}.

El método basado en la utilización del radical DPPH[•] (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) para la medida de la actividad antioxidante es uno de los más utilizados^{16,17,18}, debido a que, en términos generales, se puede considerar simple, eficiente y barato. El método original fue desarrollado por Blois (1958)¹⁹, siendo la modificación realizada por Brand-Williams y colaboradores (1995)^{20,21} ampliamente aplicada.

⁴ Kanner, J. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 64-69.

⁵ Decker, E. A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 4303-4310.

⁶ Baoshan, S. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2009, **57**, 8623-8627.

⁷ De Beer, D. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51**, 902-909.

⁸ Granato, D. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **129**, 366-373.

⁹ Pinho, C. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **131**, 885-892.

¹⁰ Šeruga, M. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **124**, 1208-1216.

¹¹ Aliakbarian, B. *et al.*, *Journal of Supercritical Fluids*, 2012, **65**, 18-24.

¹² Bekhit, A. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **129**, 837-845.

¹³ Lafka, T. *et al.*, *Food Chem.*, 2007, **104**, 1206-1214.

¹⁴ Larrauri, J. A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 2694-2697.

¹⁵ Rockenbach, I. I. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **127**, 174-179.

¹⁶ Fogliano, V. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1999, **47**, 1035-1040.

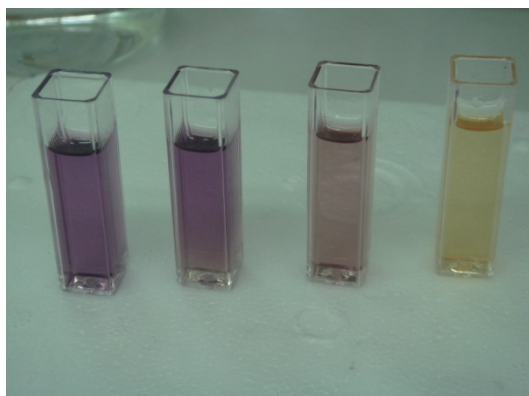
¹⁷ Magalhães, L. M. *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **613**, 1-19.

¹⁸ Sánchez-Moreno, C. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 1998, **76**, 270-276.

¹⁹ Blois, M. S., *Nature*, 1958, 181 (4617), 1199-1200.

²⁰ Brand-Williams, W. *et al.* *LWT - Food Science and Technology*, 1995, **28**, 25-30.

²¹ Bondet, V. *et al.*, *LWT - Food Science and Technology*, 1997, **30**, 609-615.



El DPPH[•] es un radical estable, que presenta una coloración púrpura y una fuerte absorción en el rango de longitud de onda de 515 – 520 nm. En presencia de compuestos antioxidantes, el DPPH[•] puede aceptar un electrón o un átomo de hidrógeno de la molécula antioxidante, alcanzando así una forma más estable. La forma reducida del DPPH presenta un color amarillo pálido, de manera que es posible estimar la actividad antioxidante de un compuesto determinando el cambio de color del DPPH espectrofotométricamente. Cuanto mayor es la capacidad de atrapar los radicales libres por parte del compuesto antioxidante, mayor será la reducción del radical DPPH[•] y menor la coloración púrpura de la muestra.

Los resultados a partir de esta metodología son expresados comúnmente como Concentración Eficiente o EC₅₀ (Efficient Concentration), que viene a indicar la cantidad de muestra que es necesaria para reducir el 50% de la concentración de DPPH[•] inicial. Este parámetro, introducido por Brand-Williams y colaboradores (1995)²² es de gran utilidad, ya que al ser independientes de la concentración de muestra, permite la comparación de resultados^{23,24}. Muchos autores han utilizado el parámetro ARP (Antiradical Power) para expresar sus resultados, que se define como el recíproco del término EC₅₀, $ARP = 1 / EC_{50}$. La finalidad de la utilización de este parámetro, es la de obtener una relación directa entre el valor del resultado y la actividad antioxidante, es decir, a mayor ARP, mayor actividad antioxidante. En el caso del parámetro EC₅₀ la relación es inversa, cuanto mayor es el resultado EC₅₀, más muestra hay que añadir

²² Brand-Williams, W. et al., *LWT - Food Science and Technology*, 1995, **28**, 25-30.

²³ Kedare, S. B. and Singh, R. P., *Journal of Food Science and Technology*, 2011, **48**, 412-422.

²⁴ Molyneux, P., *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 2004, **26(2)**, 211-219.

para inhibir el 50% del DPPH[•] y por tanto, menor será la actividad antioxidante de esa muestra.

Aun cuando este método es considerado simple y eficiente, presenta varias limitaciones que complican su ejecución:

- En primer lugar, varios estudios experimentales han demostrado que la relación entre la concentración de antioxidante y la capacidad de atrapar el radical DPPH[•] no es lineal^{25,26,27}, de manera que la medida del EC₅₀ puede ser bastante problemática. La falta de linealidad implica que es necesario estudiar el comportamiento de cada muestra y obtener una curva de calibrado para cada una. Se han de analizar varias alícuotas de cada muestra con distintas concentraciones y los resultados deben ser transferidos a una gráfica donde se muestre el porcentaje de DPPH[•] residual o inhibido frente a la concentración de muestra dividida por la concentración inicial puesta del radical. El parámetro EC₅₀ se obtiene a partir de esta curva por interpolación. Esta cuestión da lugar a dos inconvenientes fundamentales. Por un lado, es posible, especialmente cuando se analizan muestras complejas, que las curvas obtenidas no presenten buenos ajustes, por lo que los resultados irán sujetos a errores significativos. Por otro lado, cuando el número de muestras a estudiar es elevado, se requiere de un considerable tiempo y trabajo; cada muestra implicaría el análisis de al menos 4 ó 5 alícuotas (normalmente por duplicado o triplicado). Por tanto el número de determinaciones puede llegar a ser enorme, poniendo en cuestión la viabilidad del procedimiento.

²⁵ Chen, Z., *et al.*, *Food Chem.*, 2013, **138**, 414-420.

²⁶ Locatelli, M. *et al.*, *Food Chem.*, 2009, **114**, 889-897.

²⁷ Villaño, D. *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **538**, 391-398.

- En segundo lugar, varios autores han demostrado la importancia de medir hasta un estado de estabilidad de la medida en lugar de a un tiempo fijo de incubación, con el objeto de no infravalorar el resultado²⁸. El tiempo de reacción para llegar a un estado de equilibrio dependerá de la concentración y de la naturaleza del antioxidante. Sin embargo, como se ha demostrado, este tiempo de reacción no es lineal con la concentración del antioxidante²⁹. Este hecho implica la necesidad de estudiar el comportamiento cinético de cada alícuota analizada para determinar el final de la reacción, lo que implica un gasto importante de tiempo. Además, a pesar de que este método es técnicamente simple, sólo se requiere de un espectrofotómetro que mida en el visible, si el método se va aplicar con asiduidad, es casi esencial disponer de un espectrofotómetro automatizado que permita medir cinéticas en multi-celdas de forma paralela.

Finalmente, es importante comentar que este método ha sido aplicado siguiendo muchos y variados protocolos, en los que se han empleado distintos solventes, diferentes concentraciones iniciales de DPPH*, volúmenes de muestra, tiempos de incubación y presentación de los resultados, pese a que es conocido que los resultados obtenidos de acuerdo a diferentes protocolos no son comparables. Son varios los autores que han manifestado la necesidad de estandarizar adecuadamente la metodología^{30,31}.

En el estudio realizado nos hemos centrado en el hecho de que, según distintos autores, sólo para un cierto y limitado rango de concentración, existe una fiable relación lineal entre la concentración de antioxidante y el porcentaje de

²⁸ Mishra, K. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **130**, 1036-1043.

²⁹ Huang, D. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 1841-1856.

³⁰ Dawidowicz, A. L. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **131**, 1037-1043.

³¹ Sánchez-Moreno, C., *Food Sci. Technol. Int.*, 2002, **8**, 121-137.

inhibición^{32,33,34}. El objetivo de nuestro estudio ha sido determinar el rango de comportamiento lineal para muestras vínicas y subproductos, analizando las ventajas de trabajar en ese rango para poder solventar algunos de los problemas citados anteriormente. A partir de aquí, se pretende proponer un procedimiento simplificado de estimación de la actividad antioxidante, que pueda ser utilizado para la realización de análisis de rutina de este tipo de muestras.

7.1.2. Materiales y método.

7.1.2.1. Reactivos y disolventes.

El ácido gálico, ácido cafeico, (+) catequina y 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) utilizados fueron suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). El etanol empleado fue etanol absoluto para análisis de Panreac (Barcelona, España). Se utilizó agua Milli-Q obtenida a partir de un sistema de Millipore (Bedford, MA, USA).

7.1.2.2. Muestras.

Para este estudio se analizaron tres patrones de polifenoles (ácido gálico, ácido cafeico y (+) catequina), cinco tipos de vinos diferentes, un vinagre y seis extractos de subproductos de vinificación.

Los patrones de compuestos polifenólicos analizados fueron seleccionados por su habitual presencia en uvas y vinos. El ácido gálico se seleccionó como ejemplo de ácido hidroxibenzoico, el ácido cafeico como ejemplo de ácido hidroxicinámico y la

³² Buenger, J. *et al.*, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2006, **28**, 135-146.

³³ Locatelli, M. *et al.*, *Food Chem.*, 2009, **114**, 889-897.

³⁴ Villaño, D. *et al.*, *Anal. Chim. Acta*, 2005, **538**, 391-398.

catequina como flavanol. Se prepararon diferentes concentraciones de estos patrones en agua Milli-Q.

Para la elección de los vinos a estudiar, se hizo en primer lugar una diferenciación entre blancos y tintos. Desde un punto de vista químico, se consideró que todos los vinos tintos tienen una composición similar y todos los blancos son similares entre sí. A partir de este punto, se seleccionaron vinos con distintas metodologías de elaboración, a fin de utilizar vinos comunes pero los más distintos posibles entre sí. Se eligieron tres vinos blancos: uno joven y dos vinos de Jerez (dos manzanillas con distintos tiempos de crianza); dos vinos tintos: uno joven y otro con crianza; y un vinagre de Jerez. Todas las muestras fueron diluidas con agua a distintas concentraciones.

Los subproductos utilizados se obtuvieron de una bodega de la provincia de Cádiz. Orujos y pepitas de uva blanca (var. *palomino*); orujo (sin raspón), raspón y pepitas de uva tinta (var. *tempranillo*); y lías de la elaboración de vino tinto. Todos los subproductos fueron secados previamente en una cámara climática a 40 °C y en oscuridad, con la finalidad de estabilizar las muestras. Posteriormente estas muestras fueron molidas y tamizadas para obtener un tamaño de partícula homogéneo. Se realizaron extracciones de 1 gramo de muestra en 25 ml de una mezcla de EtOH/H₂O (1:1) en un baño de ultrasonido, para seguidamente filtrarlas a vacío. Se prepararon distintas alícuotas a partir de los extractos diluyendo con agua Milli-Q.

7.1.2.3. Método.

La actividad antioxidante fue determinada de acuerdo al método desarrollado por Brand-Williams et al. (1995) con algunas modificaciones. Para cada muestra, se analizaron diez alícuotas de concentraciones distintas a fin de obtener su correspondiente curva. Como el método funciona igual de bien con etanol que con

metanol³⁵, se eligió usar etanol por su menor toxicidad. Es usual que algunos vinos y vinagres presenten fenómenos de precipitación cuando la proporción alcohólica es incrementada. Este fenómeno podría darse cuando la muestra se mezcla con el medio alcohólico en el que está disuelto el DPPH[•]. Sin embargo, no se observan fenómenos de precipitación si la muestra es diluida previamente con agua. Ninguna de las alícuotas analizadas en este estudio mostró problemas de precipitación.

A 200 µl de muestra o EtOH (en el caso del blanco) se le añadió 3,3 ml de una solución 50 µM de DPPH[•] en EtOH preparada diariamente. La cantidad de DPPH[•] inicial fue elegida para obtener valores de absorbancia iniciales y finales dentro del rango de precisión espectrofotométrica³⁶, y el volumen de muestra seleccionado es apropiado para obtener buenos resultados incluso con vinos de baja actividad antioxidante. La concentración exacta de la solución de DPPH[•] en EtOH inicial, fue calculada espectrofotométricamente a partir de su correspondiente curva de calibrado, determinada por regresión lineal:

$$y = 0,0286 [\text{DPPH}] + 0,004; \quad r^2 = 0,9999$$

Donde: [DPPH] es la concentración de DPPH en ppm. Expresamos este parámetro en ppm porque los resultados finales se darán como: mg de muestra / mg de DPPH iniciales.

La absorbancia fue medida a 515 nm en un espectrofotómetro modelo Cary 50 Bio (Varian, Australia). Se realizaron medidas cada 10 minutos, hasta que la reacción alcanzó el equilibrio. La temperatura de la cámara de muestras fue en todo momento controlada a 20° C, utilizando un sistema termo-regulador (Frigiterm, P-Selecta, España). Para cada una de las alícuotas estudiadas se hizo una representación de su

³⁵ Cheng, Z. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 7429-7436.

³⁶ Sharma, O. P. and Bhat, T. K., *Food Chem.*, 2009, **113**, 1202-1205.

cinética, y el porcentaje de inhibición, una vez alcanzada la estabilidad, se determinó utilizando la siguiente ecuación:

$$I\% = (Abs\ blanco - Abs\ muestra) / Abs\ blanco \times 100$$

Estos porcentaje fueron transferidos a una gráfica, donde se representaron los resultados de cada una de las alícuotas de la muestra frente a la cantidad de muestra añadida con respecto a la cantidad de DPPH[•] inicial.

7.1.2.4. Análisis estadístico.

Todas las medidas fueron realizadas por triplicado y los resultados presentados como la media \pm la desviación estándar (SD). La linealidad fue estudiada a través de la cuantificación de los coeficientes de correlación. Se realizó una comparativa de los valores medios obtenidos entre el método de partida y el simplificado, utilizando los estadísticos *t* y *F*. La repetibilidad del método se estudió mediante el análisis de la varianza de un solo factor (one way ANOVA). Se consideró como significancia estadística $p < 0,05$. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Plus 5.1*.

7.1.3. Resultados.

7.1.3.1. Estudio de la linealidad.

En el estudio de la concentración de muestra frente a los porcentajes de inhibición del DPPH[•] (I%), cada muestra reveló un comportamiento distinto de su actividad antirradicalaria. Se ha podido observar como algunas muestras, tras

aplicarles distintos modelos de regresión, no han presentado buenos ajustes para ninguno de los modelos más usuales, tal y como se muestra en el ejemplo de la *Tabla 21*.

Tabla 21. *Vino tinto crianza. Ejemplo de los modelos aplicados en una muestra con ajustes pobres.*

MODELOS DE REGRESIÓN	ECUACIONES	R ²
Lineal	$y = 0,2497x + 32,535$	0,6759
Logarítmico	$y = 25,81\ln(x) - 45,607$	0,9539
Exponencial	$y = 30,661e^{0,0048x}$	0,5329
Polinómico	$y = -0,0021x^2 + 0,9029x + 12,727$	0,9648
Potencial	$y = 5,7176x^{0,5438}$	0,9022

Se ha podido comprobar la existencia de una relación de linealidad, entre la concentración de antioxidante y el porcentaje de inhibición del DPPH^{*}, en todas las muestras analizadas, si bien, el rango de linealidad varía notablemente en función del tipo de muestra objeto de estudio. Los patrones de compuestos polifenólicos fueron las muestras que mayor rango de linealidad mostraron; todos mostraron una relación de linealidad por debajo del 70% de inhibición del DPPH^{*}. Los subproductos de vinificación presentaron rangos de linealidad muy dispares, encontrando desde linealidad sólo por debajo del 40% de inhibición para los raspones de uva tinta, hasta linealidad por debajo del 80% de inhibición para las lías de vino tinto. Las muestras que resultaron tener menor relación de linealidad fueron las de vino y vinagre. Para los vinos blancos y el vino tinto crianza, apenas se alcanzó el 40% de inhibición cuando dejaron de mostrar una relación lineal. El vino tinto joven mostró linealidad por debajo del 60% de inhibición y el vinagre por debajo del 50% de inhibición del DPPH^{*} (*Figura 23*).

Estos resultados implican que cuando analizamos algunas muestras, como el vino blanco o el tinto crianza, el parámetro EC_{50} se encuentra en una parte curva y no bien definida de la gráfica, por lo que consecuentemente los resultados de estas muestras irán unidos a mayores errores. Basándonos en los resultados, se ha podido comprobar que todas las muestras testadas mostraron, al menos, una relación de linealidad entre la concentración de muestra y el porcentaje de inhibición del DPPH[•], por debajo del 40% de inhibición del DPPH[•]. Dado que resulta más simple y ventajoso trabajar con ajustes lineales, y que todas las muestras mostraron una relación lineal por debajo del 40% de inhibición del DPPH[•], puede considerarse conveniente trabajar con diluciones de muestras que produzcan inhibiciones del DPPH[•] por debajo de ese 40%, para así asegurar la linealidad.

Sin embargo, si se propone trabajar con inhibiciones del DPPH[•] inferiores al 40%, con la finalidad de asegurarnos trabajar en una zona de linealidad de la gráfica, los resultados no podrían ser expresados a través del parámetro EC_{50} como habitualmente se viene haciendo. En este caso, y por analogía con el EC_{50} , proponemos expresar los resultados como EC_{20} (cantidad de muestra necesaria para inhibir la cantidad de DPPH[•] inicial en un 20%). El 20% de inhibición del DPPH[•] corresponde exactamente al punto central de la zona lineal asegurada.

Trabajar en el rango de linealidad ofrece varias ventajas: por un lado nos aseguramos de que todas las muestras tendrán ajustes buenos y simples, de forma que los resultados irán asociados a menores errores. Por otro lado, permite reducir el número de diluciones necesarias para obtener la curva de calibrado sin cometer errores significativos.

7. Estudio de la actividad antioxidante

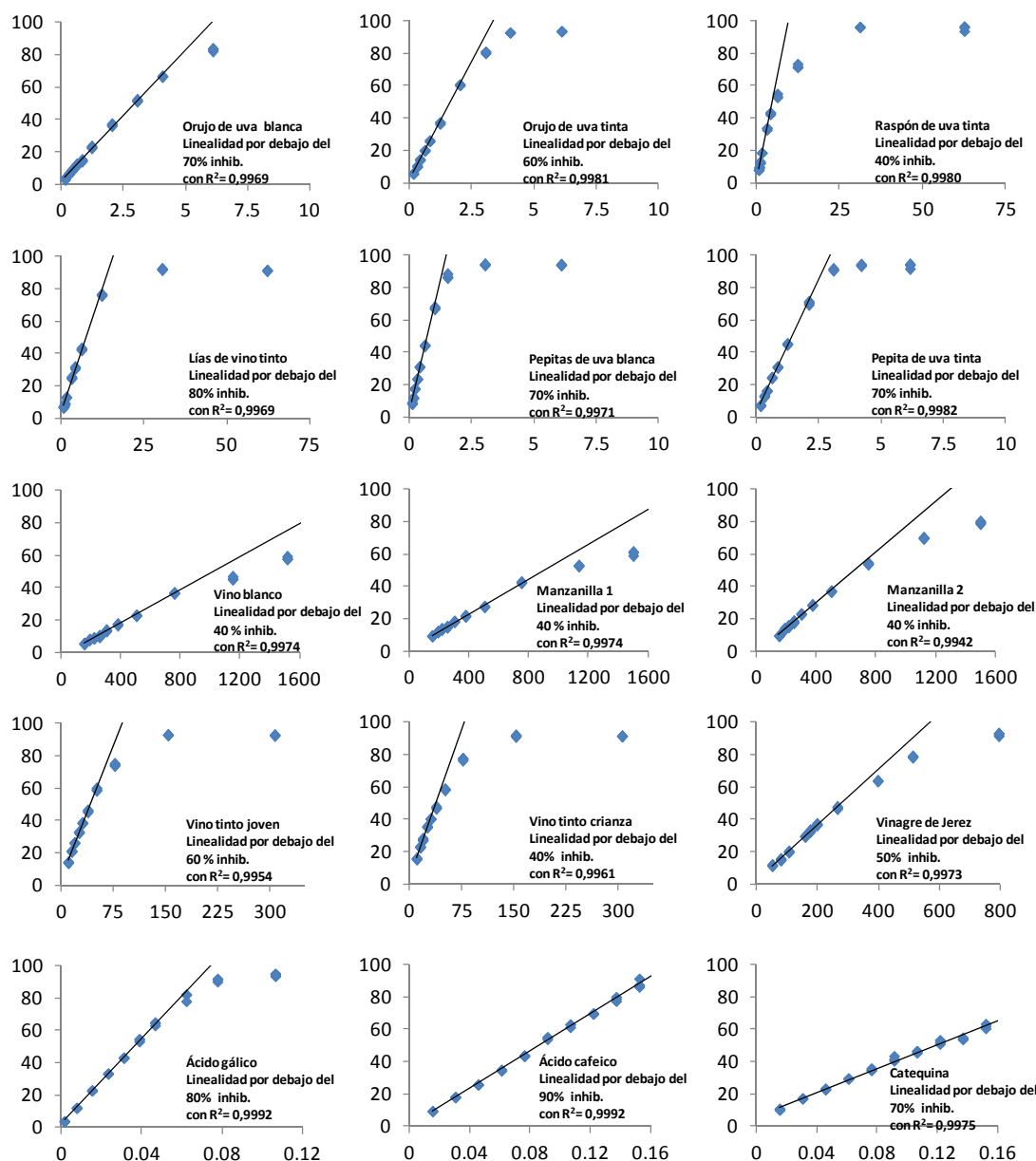


Figura 23. Representación de la actividad antioxidante de las muestras estudiadas. Estas curvas antiradicalarias se han representado como el porcentaje de inhibición del DPPH* en ordenadas frente a los miligramos de muestra añadidos por miligramos de DPPH* inicial en abscisas.

7.1.3.2. Estudio de los tiempos de reacción.

Anteriormente comentamos la necesidad, según diversos autores, de medir la inhibición del DPPH[•] hasta que la reacción alcanza un estado de equilibrio, a fin de no infravalorar los resultados³⁷. Sin embargo, esta metodología requiere de largos tiempos de medición, además de impedir la posibilidad de analizar varias muestras simultáneamente. También mencionábamos con anterioridad, la importancia de disponer de un equipo automatizado que permita medir cinéticas en multi-celdas cuando esta metodología se utiliza con mucha frecuencia. Si queremos un método eficiente pero que además sea práctico y funcional, hemos de intentar eliminar la necesidad de realizar estudios cinéticos para cada una de las muestras analizadas. Para conseguirlo, se requiere seleccionar un tiempo de reacción que nos permita medir a tiempo fijo sin que se cometan errores significativos en los resultados de ninguna muestra. A partir del análisis de los tiempos de reacción, de todas las alícuotas de las distintas muestras de este estudio, se encontró:

1º. Que los tiempos de reacción dependen de la concentración de muestra. Aunque como mencionábamos con anterioridad, distintos autores habían puesto de manifiesto que la relación entre los tiempos de reacción y las concentraciones de antioxidantes no es lineal, a partir de este estudio hemos podido determinar que si bien no es lineal, si existe cierta correlación, de forma que cuanto más baja es la concentración, menores son los tiempos de reacción. Se ha podido observar como especialmente en las muestras más complejas, como es el caso de los vinos, resulta mucho más complicado alcanzar el equilibrio, especialmente cuanto más concentrada es la alícuota, como ponemos observar en la *Figura 24*.

³⁷ Mishra, K. *et al.*, *Food Chem.*, 2012, **130**, 1036-1043.

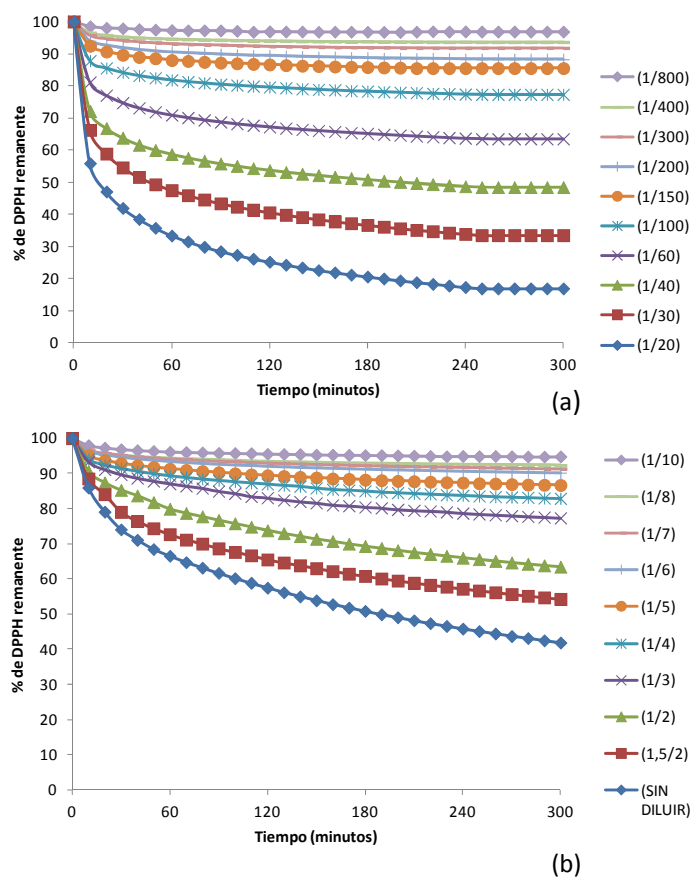


Figura 24. Ejemplos de distintos comportamientos cinéticos. Se representa el porcentaje de DPPH^{*} remanente frente al tiempo. Muestras: (a) orujo de uva blanca; (b) vino blanco.

Esto significa que las diluciones necesarias para obtener el EC₂₀ propuesto, que normalmente son mucho menos concentradas que muchas de las necesarias para aplicar el método original (Brand-Williams et al., 1995) y obtener el EC₅₀, alcanzarán el equilibrio mejor y en menor tiempo.

2º. Se ha observado que los tiempos necesarios para alcanzar el estado de equilibrio dependen de la naturaleza de la muestra, siendo muy distintos entre las diferentes muestras analizadas. Los tiempos de reacción para los extractos

de subproductos de vinificación van desde 170 a 240 minutos dependiendo de la muestra y la alícuota. Los vinos y vinagre requieren de tiempos de reacción de 300 minutos para muchas de sus alícuotas. Los patrones de polifenoles son las muestras de cinética más rápida, mostrando tiempos de reacción que van desde 30 minutos a 240 para las alícuotas más concentradas.

A partir del análisis de todos los tiempos de reacción de las alícuotas estudiadas que producen inhibiciones del DPPH[•] por debajo del 40%, y considerando el mínimo tiempo de espera posible que produzca el menor error posible en los resultados, se ha concluido que a un tiempo de incubación de 240 minutos se alcanza dicha situación de compromiso para todas las alícuotas, por lo que se entiende como una elección adecuada. Todas las alícuotas analizadas de estándares y subproductos completan la reacción en un tiempo máximo de 240 minutos, por lo que con estas muestras no se cometería error si se toma la medida a este tiempo fijo como resultado. Sin embargo, algunos vinos y el vinagre requieren más de 240 minutos para alcanzar la estabilidad. Comparando los resultados obtenidos midiendo en el estado de equilibrio con los resultados de esas mismas muestras a 240 minutos, hemos comprobado que los errores cometidos no superan el 5% excepto para el vino blanco con el que se obtiene un error del 5,69% (*Tabla 22*).

Por lo tanto, si medimos a tiempo fijo de 240 minutos no infravaloraremos los resultados, a excepción del caso de los vinos y vinagres, para los cuales el error cometido es tan pequeño que puede aceptarse a expensas de conseguir un método más práctico y útil.

Tabla 22. Diferencias entre los resultados obtenidos en el estado de equilibrio y a tiempo fijo de 240 minutos. Resultados expresados como mg de extracto, vino o patrón / mg de DPPH inicial.

MUESTRAS	EC ₂₀ EN EQUILIBRIO	EC ₂₀ a 240 MIN.	ERROR RELATIVO
Orujo uva blanca	25,37 ± 0,84	25,37 ± 0,84	0,00
Orujo uva tinta	13,96 ± 0,38	13,96 ± 0,38	0,00
Raspón uva tinta	40,44 ± 1,45	40,44 ± 1,45	0,00
Lías vino tinto	59,00 ± 2,60	59,00 ± 2,60	0,00
Pepitas uva blanca	5,98 ± 0,23	5,98 ± 0,23	0,00
Pepitas uva tinta	11,84 ± 0,38	11,84 ± 0,38	0,00
Vino blanco	438,49 ± 10,23	463,42 ± 10,93	5,69
Manzanilla 1	344,26 ± 10,10	357,94 ± 12,65	3,97
Manzanilla 2	274,16 ± 9,21	283,86 ± 9,47	3,54
Vino tinto joven	14,27 ± 0,56	14,68 ± 0,52	2,90
Vino tinto crianza	13,36 ± 0,51	13,99 ± 0,64	4,73
Vinagre de Jerez	103,33 ± 3,05	103,33 ± 3,66	4,47
Ácido gálico	0,013 ± 3,2x10 ⁻⁴	0,013 ± 3,2x10 ⁻⁴	0,00
Ácido cafeico	0,034 ± 6,9x10 ⁻⁴	0,034 ± 6,9x10 ⁻⁴	0,00
Catequina	0,038 ± 12,0x10 ⁻⁴	0,038 ± 12,0x10 ⁻⁴	0,00

7.1.3.3. Simplificación del método.

Aunque la práctica normal para realizar una curva de calibrado implicaría el estudio de al menos 4 ó 5 diluciones, se ha estudiado la posibilidad de construir las rectas antiradicalarias con sólo 3 puntos (por duplicado) en el rango del 40% de inhibición del DPPH[•], con el objetivo de simplificar el procedimiento tanto como sea posible. El análisis de los resultados ha demostrado que es posible obtener el parámetro EC₂₀ de esta forma sin errores significativos, a condición de que al menos uno de los puntos esté por debajo del 20% de inhibición y otro esté entre el 20% - 40% de inhibición del DPPH[•]. En otras palabras, es necesario que el EC₂₀ esté entre los puntos obtenidos para así minimizar el error. Si no tenemos de antemano ninguna información sobre la actividad antioxidante de la muestra a analizar, será necesario realizar una medida de prueba inicial, ensayando con una única alícuota, para a partir de esta medida poder determinar fácilmente las concentraciones aproximadas necesarias para tener inhibiciones por debajo del 20% y entre el 20% - 40%. En la *Tabla*

23 se muestran los resultados obtenidos para el parámetro EC_{20} , en el rango de linealidad, a partir de varios puntos por triplicado y obtenido a partir de la medida de sólo tres puntos por duplicado, siguiendo la condición mencionada. El análisis estadístico reveló que no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos mediante ambos procedimientos a $p < 0,05$.

Tabla 23. Comparativa del EC_{20} obtenido a partir de varios puntos por triplicado y con dos puntos por duplicado de acuerdo a la propuesta realizada, en el rango de linealidad. La última columna muestra el error relativo entre los resultados obtenidos.

MUESTRAS	PTOS	REGRESIÓN LINEAL	R ²	EC20 ± DS	PTOS	REGRESIÓN LINEAL	R ²	EC20 ± DS	ERROR
Orujo uva blanca	7	$y = 0,7564x + 0,8120$	0,9969	$25,37 \pm 0,84$	3	$y = 0,7695x - 0,3063$	0,9946	$25,59 \pm 1,16$	0,88
Orujo uva tinta	6	$y = 1,3037x + 1,7959$	0,9981	$13,96 \pm 0,38$	3	$y = 1,2606x + 2,6035$	0,9993	$13,80 \pm 0,27$	1,17
Raspón uva tinta	6	$y = 0,4420x + 2,1277$	0,9980	$40,44 \pm 1,45$	3	$y = 0,4415x + 2,3491$	0,9963	$39,98 \pm 1,62$	1,12
Lías vino tinto	7	$y = 0,2948x + 2,6048$	0,9969	$59,00 \pm 2,60$	3	$y = 0,3350x + 1,1321$	0,9983	$56,33 \pm 1,11$	4,53
Pepitas uva blanca	6	$y = 3,0455x + 1,7820$	0,9971	$5,98 \pm 0,23$	3	$y = 3,0163x + 2,5100$	0,9850	$5,80 \pm 0,32$	3,07
Pepitas uva tinta	6	$y = 1,5304x + 1,8796$	0,9982	$11,84 \pm 0,38$	3	$y = 1,5208x + 1,9869$	0,9920	$11,84 \pm 0,49$	0,03
Vino blanco	8	$y = 0,0510x - 2,3616$	0,9974	$438,49 \pm 10,23$	3	$y = 0,0513x - 2,5942$	0,9975	$440,76 \pm 10,74$	0,52
Manzanilla 1	8	$y = 0,0542x + 1,3308$	0,9974	$344,26 \pm 10,10$	3	$y = 0,0506x + 2,2065$	0,9939	$351,75 \pm 10,60$	2,18
Manzanilla 2	7	$y = 0,0779x - 1,3526$	0,9942	$274,16 \pm 9,21$	3	$y = 0,0782x - 0,8246$	0,9987	$266,08 \pm 3,65$	2,95
Vino tinto joven	5	$y = 1,1669x + 3,3446$	0,9954	$14,27 \pm 0,56$	3	$y = 1,3502x + 0,6145$	0,9976	$14,38 \pm 0,24$	0,58
Vino tinto crianza	5	$y = 1,2263x + 3,6138$	0,9961	$13,36 \pm 0,51$	3	$y = 1,3659x + 1,6682$	0,9931	$13,42 \pm 0,40$	0,44
Vinagre de Jerez	6	$y = 0,1753x + 1,8829$	0,9973	$103,33 \pm 3,05$	3	$y = 0,1795x + 0,8967$	0,9974	$106,42 \pm 2,25$	2,99
Ácido gálico	5	$y = 1324,8x + 2,2477$	0,9992	$0,013 \pm 3,2 \times 10^{-4}$	3	$y = 1291,8x + 3,1084$	0,9994	$0,013 \pm 2,5 \times 10^{-4}$	2,42
Ácido cafeico	5	$y = 561,7x + 0,7572$	0,9992	$0,034 \pm 6,9 \times 10^{-4}$	3	$y = 537,5x + 1,7310$	0,9974	$0,034 \pm 8,9 \times 10^{-4}$	0,78
Catequina	5	$y = 398,4x + 4,8943$	0,9975	$0,038 \pm 12,0 \times 10^{-4}$	3	$y = 403,8x + 4,6880$	0,9970	$0,038 \pm 9,3 \times 10^{-4}$	0,01

Adicionalmente, y como un paso más hacia la simplificación, se estudió la posibilidad de obtener el EC_{20} a partir de la medida de una única alícuota. Teóricamente, si una dilución con una concentración x_1 es analizada, obteniéndose una inhibición y_1 , y si queremos conocer el valor EC_{20} que produce una inhibición $y_2 = 20$, entonces:

$$EC_{20} = \frac{y_2 \times x_1}{y_1} + \frac{b}{m} \left(\frac{y_2 - y_1}{y_1} \right)$$

Donde: b es la intersección con la ordenada, m es a pendiente de la recta y $\frac{b}{m} \left(\frac{y_2 - y_1}{y_1} \right)$ es el factor que no es considerado cuando se utiliza un único punto y la curva de calibrado es desconocida. Desarrollando esta expresión matemática para obtener un error menor de $\pm 0,05 EC_{20}$, y considerando que el valor b es bajo y no muy distinto para todas las muestras estudiadas; si estimamos el valor b como el máximo valor obtenido en nuestro grupo de muestras reales, resulta que: $17 \leq y_1 \leq 25$. Por consiguiente, teóricamente, si analizamos una alícuota que presente una inhibición lo suficientemente cerca del 20%, específicamente con una inhibición entre el 17 y el 25%, podremos obtener el valor de EC_{20} con un error máximo del 5%. Para comprobar esta hipótesis, se analizaron todas las muestras a partir de una única alícuota por triplicado, siguiendo la premisa considerada, y se compararon los resultados con los obtenidos a partir de curvas hechas con varios puntos. Se pudo verificar experimentalmente que la hipótesis planteada se cumple en todos los casos estudiados. En la *Tabla 24* se muestran los resultados obtenidos a partir de este análisis. Para obtener inhibiciones en el rango propuesto, sólo es necesario hacer una medida preliminar de la muestra, para a partir de esta determinar la concentración aproximada que se necesitaría utilizar.

Por tanto, y en base a los resultados, es posible reducir el número de alícuotas necesarias para obtener la curva antirradicalaria, de cinco o seis alícuotas necesarias en el método original, a tres o incluso una, trabajando en la zona lineal, con porcentajes de inhibición del DPPH* por debajo del 40%, y siguiendo las premisas anteriormente mencionadas, obteniendo así resultados sin errores significativos.

Tabla 24. EC_{20} obtenidos a partir del análisis de una única alícuota por triplicado, en el rango lineal, siguiendo la premisa considerada. La última columna muestra el error relativo obtenido al comparar estos resultados con los obtenidos de EC_{20} a partir de varios puntos por triplicado.

MUESTRAS	PUNTOS	$EC_{20} \pm DS$	ERROR
Orujo uva blanca	1	$24,97 \pm 0,60$	1,59
Orujo uva tinta	1	$13,74 \pm 0,26$	1,59
Raspón uva tinta	1	$42,04 \pm 0,85$	3,97
Lías vino tinto	1	$56,46 \pm 1,18$	4,30
Pepitas uva blanca	1	$6,14 \pm 0,04$	2,70
Pepitas uva tinta	1	$11,64 \pm 0,05$	1,67
Vino blanco	1	$444,63 \pm 4,56$	1,40
Manzanilla 1	1	$347,39 \pm 5,23$	0,91
Manzanilla 2	1	$278,707 \pm 9,35$	1,66
Vino tinto joven	1	$14,25 \pm 0,17$	0,16
Vino tinto crianza	1	$13,30 \pm 0,20$	0,46
Vinagre de Jerez	1	$106,54 \pm 1,61$	3,11
Ácido gálico	1	$0,013 \pm 1,4 \times 10^{-4}$	0,27
Ácido cafeico	1	$0,034 \pm 5,2 \times 10^{-4}$	1,88
Catequina	1	$0,040 \pm 7,5 \times 10^{-4}$	4,40

7.1.3.4. Estudio de la repetibilidad.

Con el objetivo de conocer la repetibilidad del método simplificado, se determinó el parámetro EC_{20} para una muestra real, un vino tinto joven, siguiendo las condiciones expuestas para la estimación a partir de una única alícuota. Las muestras fueron guardadas en oscuridad y se midieron después de 240 minutos. Este proceso se realizó 9 veces en un mismo día y se repitió en tres días diferentes. Del análisis de las varianzas (ANOVA), se verificó que no existían diferencias significativas entre los resultados obtenidos. El RSD intra-día fue de 0,93% y el inter-día de 0,31%. Estas relativamente bajas desviaciones estándar relativas indican una buena repetibilidad del método.

7.1.4. Conclusiones.

- Trabajando con porcentajes de inhibición del DPPH[•] por debajo del 40%, nos aseguramos de que existe una relación lineal entre los porcentajes de inhibición del DPPH[•] y las concentraciones de muestra, para muestras vínicas y subproductos de vinificación. Este hecho permite conseguir siempre buenos ajustes y poder simplificar el procedimiento con el análisis de un considerable menor número de alícuotas. Se ha propuesto expresar los resultados en un nuevo parámetro más apropiado, el EC₂₀. Este parámetro podría sustituir al actual EC₅₀, que se encuentra en muchos casos en zonas de relación no lineal y no bien definidas, por lo que puede resultar dificultoso determinarlo con exactitud. Adicionalmente, el parámetro EC₂₀, nos permite obtener resultado para muchas muestras de reactividad limitada, que no llegan a producir un 50% de inhibición del DPPH[•]. El parámetro EC₂₀ puede obtenerse, trabajando en la zona lineal, a partir del análisis de tres alícuotas, a condición de que el EC₂₀ esté entre los puntos analizados, para así disminuir el error. Se ha comprobado como es posible obtener el EC₂₀ incluso del análisis de una única alícuota, siempre y cuando la inhibición de esa alícuota esté próxima al 20%, específicamente entre el 17 - 25% de inhibición del DPPH[•]. En base a los resultados obtenidos, no existen errores significativos al realizar estas simplificaciones si se siguen las premisas consideradas.
- A los rangos de inhibición por debajo del 40%, se alcanza antes y más claramente el equilibrio de la reacción. Las muestras pueden ser medidas a un tiempo fijo de 240 minutos sin cometer errores significativos, descartándose de esta forma la necesidad de realizar estudios cinéticos. Aunque a priori, tener que esperar 240 minutos para

obtener los resultados pueda no parecer una ventaja o simplificación, evitar la necesidad de realizar estudios cinéticos implica: por un lado, que se pueden medir muchas muestras al mismo tiempo, y por otro, que las medidas pueden realizarse en un espectrofotómetro simple (sin necesidad de equipos que midan cinéticas).

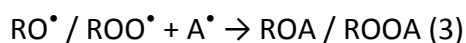
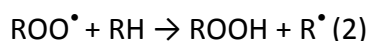
- Debe tenerse en cuenta que, desde un punto de vista químico, todas las muestras de origen vínico tienen una matriz similar. Si consideramos los resultados obtenidos para los vinos blancos analizados, puede observarse como las curvas de calibración son bastante similares entre sí y los valores de EC_{20} están todos en el mismo orden de magnitud. Si se analizan los resultados de los vinos tintos, de nuevo se encuentran ajustes y resultados similares entre sí. Teniendo en cuenta la heterogeneidad de las muestras analizadas, ya sea por su naturaleza o por el procedimiento de elaboración, y que aún así para todas es válido el procedimiento establecido, se puede entonces considerar viable inferir los resultados obtenidos y utilizar el procedimiento desarrollado para el análisis de muestras de vinos y subproductos vitivinícolas. La simplificación del procedimiento permite su utilización para la realización de análisis de rutina.

7.2. MEDIDA DE LA ACTIVIDAD ANTIOXIDANTE PARA LOS SUBPRODUCTOS ESTUDIADOS.

7.2.1. Introducción.

Como ya hemos mencionado en el apartado anterior, la medida de la actividad antioxidante resulta de gran importancia desde un punto de vista científico e industrial. Por un lado, los compuestos antioxidantes se han relacionado con efectos beneficiosos sobre la salud^{38,39}, y por otro impiden la oxidación de muchos productos elaborados, asegurando sus cualidades y manteniendo su calidad⁴⁰.

Los compuestos antioxidantes pueden atrapar los radicales libres mediante la donación de un átomo de hidrógeno o un electrón, produciendo un radical más estable y menos capaz de producir autooxidación (1), pudiendo intervenir en la etapa de propagación (1,2) y terminación de proceso radicalario (3)⁴¹.



La capacidad antioxidante depende de muchos factores como la estructura del antioxidante, concentración, condiciones de la oxidación y naturaleza de la muestra oxidada. A menudo, los compuestos antioxidantes pueden perder su actividad a altas

³⁸ Briviba, K. *et al.*, *J. Nutr.*, 2002, **132**, 2814-2818.

³⁹ Kanner, J. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1994, **42**, 64-69.

⁴⁰ Decker, E. A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2005, **53**, 4303-4310.

⁴¹ Shahidi, F. and Ambigaipalan, P., *J. Funct. Foods*, 2015, **18**, 820-897.

concentraciones, convirtiéndose en prooxidantes y participando en reacciones de iniciación del proceso radicalario. La actividad prooxidante será menor cuanto mayor variabilidad de antioxidantes presente la muestra⁴².

Los efectos de los antioxidantes *in vivo* pueden ser muy distintos a los encontrados *in vitro*, ya que resulta ser un factor determinante la biodisponibilidad del compuesto en el organismo. Sin embargo, los métodos para medir la actividad antioxidante *in vitro* constituyen una herramienta muy importante para entender el modo de acción y conocer potencial de los compuestos estudiados.

7.2.2. Materiales y métodos.

7.2.2.1. Reactivos y disolventes.

Para este estudio se utilizó el radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) suministrados por Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y etanol absoluto para análisis de Panreac (Barcelona, España).

7.2.2.2. Metodología.

La medida de la actividad antioxidante se llevó a cabo de acuerdo al método DPPH simplificado, expuesto y desarrollado en la primera parte de este capítulo

7.2.2.3. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se han expresado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un estudio

⁴² Boudet, A., *Phytochemistry*, 2007, **68**, 2722-2735.

comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA), considerándose como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

7.2.3. Resultados y discusión.

En la *Figura 25* se representan los datos obtenidos para la medida de la actividad antioxidante en uvas de aclareo y orujos.

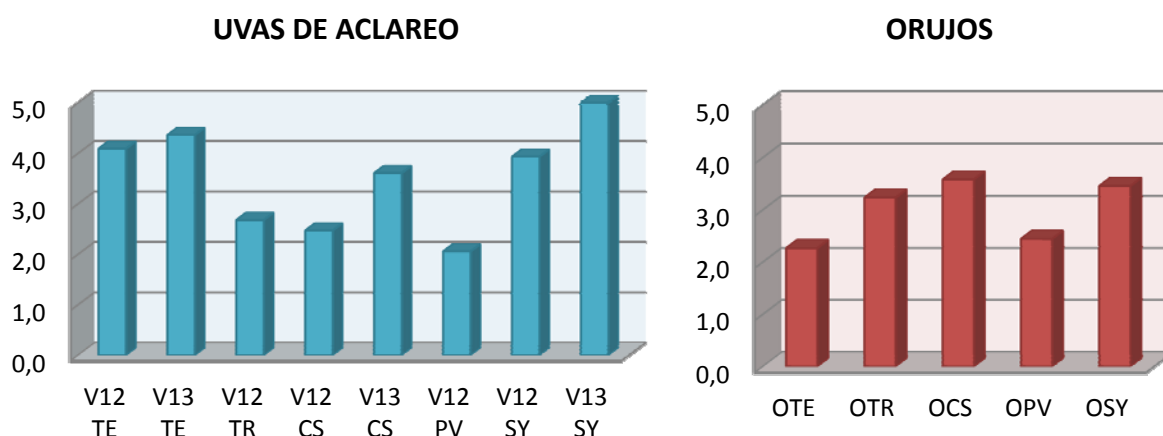


Figura 25. Representación gráfica de los resultados obtenidos en la medida de la actividad antioxidante para uvas de aclareo y orujos. Los datos se representan como los valores medios de análisis realizados por duplicado. En el caso de los orujos, valores medios de los análisis por duplicado de las tres vendimias estudiadas. Los datos están expresados como EC_{20} (cantidad de subproducto necesaria para inhibir el 20% del DPPH inicial, en mg / mg de DPPH inicial). V12, vendimia 2012; V13, vendimia 2013; O, orujos; TE, tempranillo; TR, tintilla de Rota; CS, cabernet sauvignon; PV, petit verdot; SY, syrah.

✓ **Uva de aclareo.**

Para las uvas de aclareo se obtuvieron valores de EC_{20} comprendidos entre 2,06 y 5,00 mg de uva de aclareo / mg de DPPH inicial, obteniéndose un valor promedio de 3,53 mg de uva de aclareo / mg de DPPH inicial. Para que sirva de referencia, el valor medio del EC_{20} obtenido para las uvas de vendimia fue de 6,43 mg de uva / mg de DPPH inicial. Por consiguiente, en términos medios, podríamos decir que un mg de uva de aclareo tiene casi el doble de actividad antioxidante que un miligramo de uva de vendimia. Como puede observarse, se obtuvo una gran variabilidad entre los resultados de las uvas de aclareo. Hemos de recordar que cuanto mayor es el valor de EC_{20} menor actividad antioxidante presenta la muestra. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas por variedad de uva. Fueron las variedades petit verdot y tintilla de Rota las que mostraron tener una mayor actividad antioxidante, mientras que las variedades syrah y tempranillo componían el grupo de las de menor actividad (Figura 26).

Hay que considerar que aunque todas las uvas de aclareo fueron recogidas próximas al momento de envero, no todas. Teniendo en cuenta el estado de maduración de la uva de aclareo, no se establecieron diferencias significativas entre la maduración y la actividad antioxidante. Aunque puede parecer contradictorio, ya que se obtuvo que el contenido polifenólico depende del estado de maduración y gran parte de la actividad antioxidante se asocia a este contenido, no hemos de olvidar que mientras que para algunas familias de polifenoles el contenido baja con la maduración, para otras, como es el caso de los antocianos, aumenta. De igual forma, también hay que tener en cuenta que no todos los compuestos poseen la misma actividad antioxidante, por ejemplo, a los antocianos se les ha atribuido una gran actividad, y que se pueden establecer relaciones de sinergismo y antagonismo entre distintos compuestos en cuanto a la actividad antioxidante se refiere.

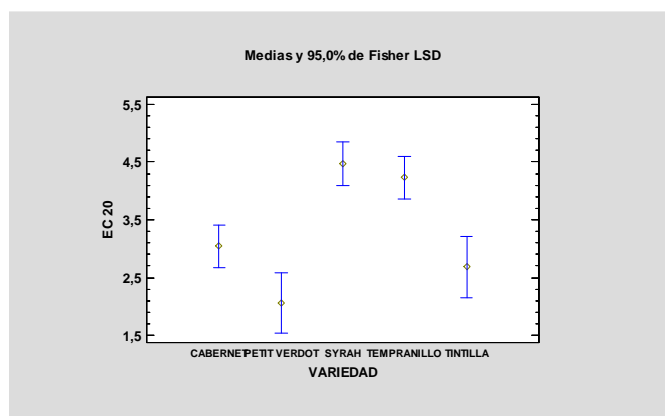


Figura 26. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para los valores EC₂₀ de las uvas de aclero por variedad.

✓ Orujos.

Se obtuvieron valores de EC₂₀ para los orujos de 2,27 a 3,58 y un valor promedio de 3,02 mg de orujo / mg de DPPH inicial. Esto significa que la actividad antioxidante está en el mismo orden de la obtenida para las uvas de aclero, y que un miligramo de orujo tiene algo más de tres veces la actividad antioxidante de un miligramo de uvas de vendimia. Se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las distintas vendimias. Al estudiar los resultados de la actividad por variedad de orujo, aparecieron diferencias significativas entre las distintas variedades. En este caso fueron las variedades cabernet sauvignon, tempranillo y petit verdot las de mayor actividad antioxidante (Figura 27).

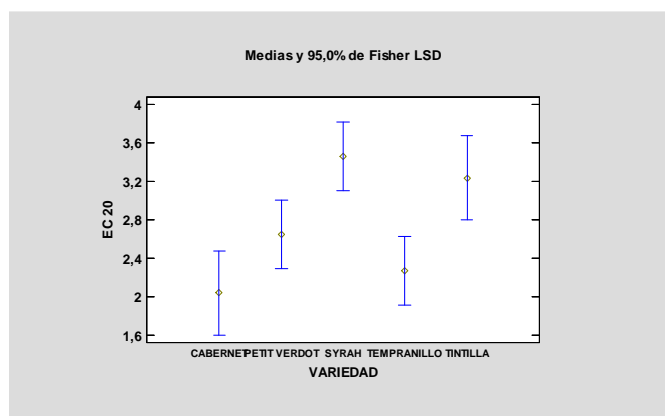


Figura 27. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para los valores EC_{20} de los orujos estudiados por variedad.

7.2.4. Conclusiones.

- De manera general y promediada, los resultados obtenidos para la uva de aclareo y los orujos han estado en el mismo orden, siendo aproximadamente un 15% mayor para los orujos. Ambos tipos de muestra presenta una actividad alrededor de tres veces mayor a la de la uva de vendimia. De manera individualizada, por variedad, estadísticamente se diferencian los resultados para ambos tipos de subproductos, pero son sólo los orujos de la variedad syrah y especialmente los de tempranillo los que presentan una mayor actividad que su correspondiente uva de aclareo, para el resto la relación es inversa.
- El EC_{20} medio obtenido para el aclareo es de 3,528 mg de uva de aclareo / mg de DPPH inicial. Las uvas de aclareo de las variedades petit verdot y tintilla de Rota son las que muestran mayor actividad antioxidante.

Aparecen diferencias entre las distintas vendimias pero no con respecto a la madurez de la uva.

- Para los orujos el EC₂₀ medio hallado fue de 3,024 mg de orujo / mg de DPPH inicial. Aparecen diferencias con respecto al año de vendimia y la variedad. Son los orujos de petit verdot y tempranillo los preferibles en cuanto a su actividad antioxidante.
- Por tanto, ambos tipos de subproductos presentan una similar e importante actividad antioxidante. Habría que tener en cuenta la variedad en ambos casos, siendo la variedad petit verdot una buena elección, en relación a la actividad mostrada, en ambos subproductos.

7.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Aliakbarian, B., Fathi, A., Perego, P., & Dehghani, F. (2012). Extraction of antioxidants from winery wastes using subcritical water. *Journal of Supercritical Fluids*, 65, 18-24.
- Baoshan, S., Spranger, I., Yang, J., Leandro, C., Guo, L., Canário, S., Zhao, Y., & Chunfu, W. (2009). Red wine phenolic complexes and their in vitro antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(18), 8623-8627.
- Bekhit, A., Cheng, V. J., McConnell, M., Zhao, J. H., Sedcole, R., & Harrison, R. (2011). Antioxidant activities, sensory and anti-influenza activity of grape skin tea infusion. *Food Chemistry*, 129(3), 837-845.
- Blois, M. S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181 (4617), 1199-1200.
- Bondet, V., Brand-Williams, W., & Berset, C. (1997). Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH[•] free radical method. *LWT - Food Science and Technology*, 30(6), 609-615.
- Boudet, A. (2007). Evolution and current status of research in phenolic compounds. *Phytochemistry*, 68(22-24), 2722-2735.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Briviba, K., Pan, L., & Rechkemmer, G. (2002). Red wine polyphenols inhibit the growth of colon carcinoma cells and modulate the activation pattern of mitogen-activated protein kinases. *Journal of Nutrition*, 132(9), 2814-2818.
- Buenger, J., Ackermann, H., Jentzsch, A., Mehling, A., Pfitzner, I., Reiffen, K. A., Schroeder, K., & Wollenweber, U. (2006). An interlaboratory comparison of methods used to assess antioxidant potentials. *International Journal of Cosmetic Science*, 28(2), 135-146.
- Chen, Z., Bertin, R., & Frolidi, G. (2013). EC50 estimation of antioxidant activity in DPPH[•] assay using several statistical programs. *Food Chemistry*, 138(1), 414-420.
- Cheng, Z., Moore, J., & Yu, L. (2006). High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(20), 7429-7436.
- Dawidowicz, A. L., Wianowska, D., & Olszowy, M. (2012). On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). *Food Chemistry*, 131(3), 1037-1043.
- De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W. C. A., & Manley, M. (2003). Antioxidant activity of South African red and white cultivar wines: Free radical scavenging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 902-909.

7. Estudio de la actividad antioxidante

- Decker, E. A., Warner, K., Richards, M. P., & Shahidi, F. (2005). Measuring antioxidant effectiveness in food. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(10), 4303-4310.
- De Gaetano, G., Di Castelnuovo, A., & Rotondo, S. (2005). Cardiovascular protective effect of moderate wine consumption: Evidence after the French Paradox. *Sang Thrombose Vaisseaux*, 17(1), 47-60.
- Fernández-Mar, M. I., Mateos, R., García-Parrilla, M. C., Puertas, B., & Cantos-Villar, E. (2012). Bioactive compounds in wine: Resveratrol, hydroxytyrosol and melatonin: A review. *Food Chemistry*, 130(4), 797-813.
- Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G., & Ritieni, A. (1999). Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(3), 1035-1040.
- Granato, D., Katayama, F. C. U., & De Castro, I. A. (2011). Phenolic composition of South American red wines classified according to their antioxidant activity, retail price and sensory quality. *Food Chemistry*, 129(2), 366-373.
- Huang, D., Boxin, O. U., & Prior, R. L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(6), 1841-1856.
- Kanner, J., Frankel, E., Granit, R., German, B., & Kinsella, J. E. (1994). Natural antioxidants in grapes and wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(1), 64-69.
- Kedare, S. B., & Singh, R. P. (2011). Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. *Journal of Food Science and Technology*, 48(4), 412-422.
- Lafka, T., Sinanoglou, V., & Lazos, E. S. (2007). On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chemistry*, 104(3), 1206-1214.
- Larrauri, J. A., Sánchez-Moreno, C., & Saura-Calixto, F. (1998). Effect of Temperature on the Free Radical Scavenging Capacity of Extracts from Red and White Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(7), 2694-2697.
- Locatelli, M., Gindro, R., Travaglia, F., Coisson, J. D., Rinaldi, M., & Arlorio, M. (2009). Study of the DPPH[•]-scavenging activity: Development of a free software for the correct interpretation of data. *Food Chemistry*, 114(3), 889-897.
- Magalhães, L. M., Segundo, M. A., Reis, S., & Lima, J. L. F. C. (2008). Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613(1), 1-19.
- Mishra, K., Ojha, H., & Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130(4), 1036-1043.
- Molyneux, P. (2004). The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 26(2), 211-219.

- Pinho, C., Couto, A. I., Valentão, P., Andrade, P., & Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2012). Assessing the anthocyanic composition of Port wines and musts and their free radical scavenging capacity. *Food Chemistry*, 131(3), 885-892.
- Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Gonzaga, L. V., Caliari, V., Genovese, M. I., Goncalves, A. E. D. S. S., & Fett, R. (2011). Phenolic compounds content and antioxidant activity in pomace from selected red grapes (*Vitis vinifera* L. and *Vitis labrusca* L.) widely produced in Brazil. *Food Chemistry*, 127(1), 174-179.
- Sánchez-Moreno, C. (2002). Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science and Technology International*, 8(3), 121-137.
- Sánchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., & Saura-Calixto, F. (1998). A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *Journal of the science of food and agriculture*, 76(2), 270-276.
- Šeruga, M., Novak, I., & Jakobek, L. (2011). Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. *Food Chemistry*, 124(3), 1208-1216.
- Shahidi, F., & Ambigaipalan, P. (2015). Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects - A review. *Journal of Functional Foods*, 18, 820-897.
- Sharma, O. P., & Bhat, T. K. (2009). DPPH antioxidant assay revisited. *Food Chemistry*, 113(4), 1202-1205.
- Villaño, D., Fernández-Pachón, M. S., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2005). Comparison of antioxidant activity of wine phenolic compounds and metabolites in vitro. *Analytica Chimica Acta*, 538(1-2), 391-398.

CAPÍTULO 8. CARACTERIZACIÓN DEL ACEITE DE ORUJOS Y PEPITAS.

8.1. INTRODUCCIÓN.

En los últimos años ha aumentado el interés por la búsqueda y uso de aceites vegetales no convencionales ricos en compuestos con alta actividad biológica¹. El aceite de pepita de uva ha emergido como un producto con un alto potencial para ser usado con fines culinarios, farmacológicos o cosméticos debido a las peculiaridades de su composición^{2,3,4}. Este aceite es rico en ácidos grasos insaturados, fundamentalmente ácido linoleico, y vitamina E⁵. Las pepitas de uvas contienen entre un 10 – 20% de aceite. La cantidad de aceite así como su composición depende de manera muy acusada de factores como la variedad de uva y las condiciones de cultivo^{6,7,8}. Se han evaluado diferentes aceites de pepitas procedentes de países como Francia, Italia y España, determinándose que es posible distinguir el origen del aceite en base a su perfil lipídico⁹. Por este motivo, diversos autores han realizado estudios de aceites de pepitas procedentes de distintos genotipos propios de diferentes países^{10,11,12}.

¹ Górnas, P. *et al.*, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **48**, 178-182.

² Fernandes, L. *et al.*, *Food Res. Int.*, 2013, **50**, 161-166.

³ Hassanein, M. M. and Abedel-Razek, A. G., *J Oleo Sci*, 2009, **58**, 227-233.

⁴ Kim, H. *et al.*, *JAOCs J Am Oil Chem Soc*, 2008, **85**, 487-489.

⁵ Lutterodt, H. *et al.*, *Food Chem.*, 2011, **128**, 391–399.

⁶ Crews, C. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6261-6265.

⁷ Oomah, B. D. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1998, **46**, 4017-4021.

⁸ Sabir, A. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2012, **92**, 1982-1987.

⁹ Della Corte, A. *et al.*, *Talanta*, 2015, **140**, 52–61.

¹⁰ Fernandes, L. *et al.*, *Food Res. Int.*, 2013, **50**, 161–166.

¹¹ Lachman, J. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2015, **63**, 620–625.

¹² Sabir, A. *et al.*, *J. Sci. Food Agric.*, 2012, **92**, 1982–1987.

En base a esta exposición, consideramos que puede resultar de interés el estudio de los aceites de pepitas de las variedades más usuales cultivadas en nuestro entorno. En consecuencia se ha realizado un estudio de:

- Los aceites de pepitas de uvas de distintas variedades comunes en Andalucía.
- Los aceites procedentes de la extracción del orujo completo de las mismas variedades. Aunque es sabido que el contenido lipídico se encuentra de forma mayoritaria en la semilla de la uva, se planteó que poder extraer el aceite directamente a partir de todo el orujo supondría una ventaja en cuanto a que se suprime la etapa de separación de las pepitas del resto del orujo; además de la posibilidad de, quizás, conseguir un aceite con características diferenciadas. Por tanto, se consideró necesario realizar una comparativa entre ambos tipos de aceites a fin de conocer las posibles diferencias y la viabilidad del supuesto planteado.

Las variedades seleccionadas para este estudio fueron variedades tanto blancas como tintas. Se eligieron las variedades: palomino, pedro ximénez, moscatel, tempranillo y tintilla de Rota, por ser todas abundantemente cultivadas en nuestra región. En base a los resultados obtenidos, el estudio se completó con el análisis de los aceites de las variedades tintas caracterizadas en esta tesis: tempranillo, tintilla de Rota, cabernet sauvignon, petit verdot y syrah.

La caracterización de los aceites consistió en la determinación del contenido en ácidos grasos y en vitamina E (tocoferoles).

- **Ácidos Grasos.**

Los ácidos grasos están formados por una larga cadena hidrocarbonada que presenta en uno de sus extremos un grupo carboxilo. Los ácidos grasos pocas veces se encuentran libres en la naturaleza, generalmente aparecen de forma esterificada como componentes básicos de distintos lípidos. Los lípidos son un grupo de biomoléculas químicamente muy diverso que desempeñan funciones biológicas muy variadas: estructural, energética, protectora, reguladora y transportadora. Según su estructura se pueden clasificar en saponificables, si en su composición presentan ácidos grasos (acilglicéridos, fosfoglicéridos, esfingolípidos, ceras), e insaponificables, si no poseen ácidos grasos (terpenos, esteroides, eicosanoides). Algunos ácidos grasos son nutrientes esenciales; el ser humano es incapaz de producir algunos ácidos grasos con dobles enlaces cerca del extremo metilo de la molécula y que son esenciales para algunas funciones específicas. Este es el caso del ácido linolénico (ω -3), linoleico y araquidónico (ω -6). Los ácidos grasos poliinsaturados ω -3 y ω -6 son de gran importancia. Esta nomenclatura indica el último átomo de carbono con doble enlace contando desde el extremo omega, es decir, desde el terminal metilo de la cadena.

NOMENCLATURA	NOMBRE COMÚN	ÁTOMOS DE CARBONO	DOBLES ENLACES
C12:0	Ácido láurico	12	—
C14:0	Ácido mirístico	14	—
C16:0	Ácido palmítico	16	—
C16:1	Ácido palmitoleico	16	C9
C18:0	Ácido esteárico	18	—
C18:1	Ácido oleico	18	C9
C18:2	Ácido linoleico	18	C9 y C12
C18:3	Ácido linolénico	18	C9, C12 y C15
C20:0	Ácido araquídico	20	—
C20:4	Ácido araquidónico	20	C5, C8, C11 y C14

Representación de algunos de los ácidos grasos más abundantes en la naturaleza.

- **Vitamina E.**

Vitamina E es el nombre genérico usado para describir a una familia de compuestos, tocoferoles y tocotrienoles, que tienen una estructura común: una cabeza formada por un anillo cromanol y una cadena lateral hidrofóbica como cola¹³. La cola está saturada en el caso de los tocoferoles e insaturada en el de los tocotrienoles. Existen cuatro formas naturales de tocoferoles y cuatro de tocotrienoles (α , β , γ , y δ) que se diferencian por el número y posición de los sustituyentes metilos unidos a la cabeza cromanol¹⁴. La vitamina E es una vitamina liposoluble esencial para el ser humano, que debe ser incorporada a través de la dieta. Es sintetizada por organismos fotosintéticos¹⁵, de manera que se encuentra, fundamentalmente, en vegetales y grasas de origen vegetal¹⁶. Cada aceite contiene composiciones y cantidades distintas de vitamina E¹⁷.

La vitamina E se relaciona con una importante actividad antioxidante intracelular, inhibiendo la peroxidación de los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas biológicas¹⁸. Se le han atribuido actividades hipocolesterolémica, antitumoral y neuroprotectiva^{19,20,21}. Cada una de las formas de la vitamina E tiene su propia actividad biológica, siendo considerado el α -tocoferol como una de las formas

¹³ Rupérez, F. J. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2001, **935**, 45-69.

¹⁴ Schwartz, H. *et al.*, *J. Food Compos. Anal.*, 2008, **21**, 152-161.

¹⁵ Seker, M. E. *et al.*, *J. Chromatogr. Sci.*, 2012, **50**, 97-101.

¹⁶ Pinheiro-Sant'Ana, H. M. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2011, **1218**, 8496-8502.

¹⁷ Adhikari, P. *et al.*, *Food Chem.*, 2008, **111**, 687-690.

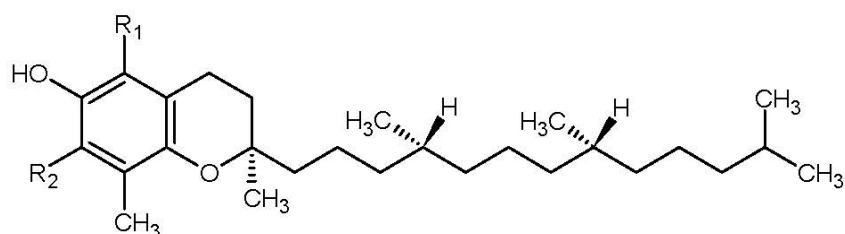
¹⁸ Wie, M. *et al.*, *J. Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2009, **111**, 1255-1258.

¹⁹ Khanna, S. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003, **278**, 43508-43515.

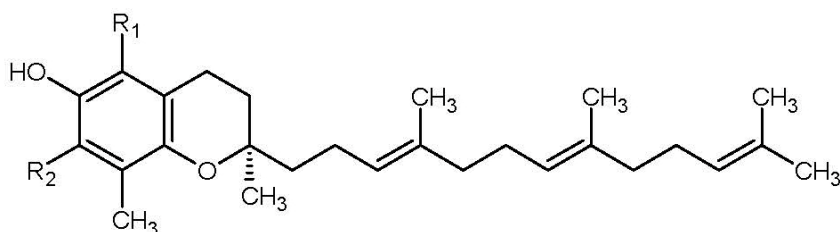
²⁰ Qureshi, A. A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2000, **48**, 3130-3140.

²¹ Ryyänen, M. *et al.*, *J. Food Compos. Anal.*, 2004, **17**, 749-765.

más activas de la vitamina E^{22,22,23,24,25}. La vitamina E ha sido ampliamente utilizada como aditivo por la industria alimentaria, farmacológica y cosmética²⁶.



Estructura tocoferol



Estructura tocotrienol

COMPUESTO	R1	R2
α	CH ₃	CH ₃
β	CH ₃	H
γ	H	CH ₃
δ	H	H

²² Dos Santos Freitas, L. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2008, **1200**, 80-83.

²³ Gliszczynska-Swiglo, A. and Sikorska, E., *J. Chromatogr. A*, 2004, **1048**, 195-198.

²⁴ Górnaś, P. *et al.*, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2015, **117**, 773-777.

²⁵ Traber, M. G. and Sies, H., *ANNU. REV. NUTR.*, 1996, **16**, 321-347.

²⁶ Agostini, F. *et al.*, *Sci. World J.*, 2012, **2012**.

8.2. CARACTERIZACIÓN.

8.2.1. Materiales y métodos.

8.2.1.1. Muestras.

Tal y como hemos mencionado en el apartado anterior se analizaron los aceites de pepitas y orujos de las variedades: palomino, moscatel, pedro ximénez, tempranillo y tintilla de Rota, todas variedades usuales en nuestra región. Estas muestras nos fueron facilitadas por una bodega de la provincia de Cádiz. Los orujos estaban compuestos por los hollejos y las pepitas, a excepción de la variedad palomino que también contenía el raspón.

En la vendimia siguiente se realizó el estudio de los aceites de los orujos de las cinco variedades tintas estudiadas en este trabajo (descritas en el apartado 3.1.): tempranillo, tintilla de Rota, cabernet sauvignon, petit verdot y syrah.

8.2.1.2. Reactivos y disolventes.

Se utilizaron patrones de tocoferoles, hexano e isopropanol suministrados por Merck (Darmstadt, Germany). El kit de patrones de ácidos grasos, MeOH anhídrido y HCl metanólico 3 N, fue de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Los solventes utilizados fueron de grado HPLC.

8.2.1.3. Metodología.

Tal y como explicamos en el capítulo 3, las extracciones se realizaron con n-hexano mediante un sistema soxhlet. La extracción del aceite de pepita con hexano es el procedimiento más habitual a nivel industrial^{27,28,29}.

Ácidos grasos.

La caracterización de los ácidos grasos se realizó mediante cromatografía de gases con un espectrómetro de masas como detector. Se realizó previamente una derivatización de los ácidos grasos mediante metilación en medio ácido, ya que las formas metil ésteres correspondientes poseen puntos de ebullición menores. Se utilizó el ácido heptadecanoico como patrón interno. La metilación se realizó utilizando una disolución de HCl en MeOH anhídrido, siguiendo el protocolo descrito por Gómez y colaboradores³⁰. Se depositan 10 mg del aceite en un tubo con tapón de rosca provisto de membrana de teflón, al que se le añade 2 ml de una disolución de HCl 1,75 M en MeOH. Al tubo se le pasa una corriente de argón durante 2 minutos, se cierra herméticamente y se calienta a 60 °C durante 18 – 24 horas. Una vez frío, se lleva a sequedad en un rotavapor y se realiza una extracción adicionando 3 ml de hexano y 1 ml de agua. Se agita y se pipetea la fase superior. A continuación, se repite la extracción añadiendo las mismas cantidades de hexano y agua. La disolución de metil ésteres en hexano se lleva a sequedad con corriente de nitrógeno y se redisuelve en 600 µL de hexano. Las muestras se inyectaron en un GC-MS Varian Saturn 2200, provisto de una columna Varian Factor Four Capillary Column VF-Waxms de 30mx0,25mm y un tamaño de partícula de 0,25 µm. Se utilizó como gas portador helio

²⁷ Fiori, L. et al., *J. Supercrit. Fluids*, 2014, **94**, 71–80.

²⁸ Lim, H. et al., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2007, **109**, 1124–1127.

²⁹ Rombaut, N. et al., *Comptes Rendus Chim.*, 2014, **17**, 284–292.

³⁰ Gómez, M. E. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2004, **52**, 4791–4794.

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

a un flujo de 1 ml/min. La temperatura de inyección fue de 250 °C y la rampa de temperatura fue de 150 – 220 °C (4 °C / min).

La identificación se realizó a partir de los tiempos de retención de sus correspondientes patrones, siendo corroborada por medio de su espectros de masas. La cuantificación se realizó a partir del factor respuesta de los patrones calculados de la siguiente manera:

$$RF_i = \left(\frac{CP_i}{AP_i} \right) \times \left(\frac{API_c}{CPI_c} \right)$$

Donde:

RF_i = Factor respuesta del ácido graso i

CP_i = Concentración del patrón i en la muestra de calibración

AP_i = Área del pico del patrón i en la muestra de calibración

API_c = Área del pico del patrón interno en la muestra de calibración

CPI_c = Concentración del patrón interno en la muestra de calibración

De esta forma, la concentración de cada ácido graso en una muestra se puede calcular a partir de la expresión:

$$C_i = \frac{RF_i \cdot CPI_m \cdot A_i}{API_m}$$

Donde:

C_i = Concentración del ácido graso i en la muestra

RF_i = Factor respuesta del ácido graso i

CPI_m = Concentración del patrón interno en la muestra

A_i = área del pico del ácido graso i en la muestra

API_m = área del pico del patrón interno en la muestra

Tocoferoles.

De acuerdo a la literatura consultada, la determinación de tocoferoles se realizó por cromatografía líquida en fase normal. Aunque de forma general la separación en fase reversa suele ser más ventajosa, en el caso de la determinación de tocoferoles la utilización de fase normal permite una mayor selectividad en la separación y poder realizar una inyección directamente sin pretratamientos³¹.

La separación cromatográfica se realizó en un HPLC Waters Alliance 2695 acoplado a un detector de fluorescencia Waters 474. Se utilizó una columna de sílica Luna de Phenomenex, de 250 x 4,60 mm y 5 µm de tamaño de partícula. El volumen de inyección fue de 10 µl y se utilizó como fase móvil hexano/isopropanol (98,7 : 1,3, v/v), con un flujo de 1 ml / min, según la metodología utilizada por Choi *et al.*^{32,33}. Los picos fueron detectados y cuantificados por fluorescencia, por comparación con sus correspondientes patrones, utilizando una longitud de onda de excitación de 290 nm y de emisión de 330 nm.

8.2.1.4. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se realizó un análisis estadístico descriptivo a cada una de las variables. Se llevó a cabo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA) de un factor, considerándose como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

³¹ Kamal-Eldin, A. *et al.*, *J. Chromatogr. A*, 2000, **881**, 217-227.

³² Choi, Y. *et al.*, *Food Chem.*, 2007, **103**, 130-138.

³³ Choi, Y. and Lee, J., *Food Chem.*, 2009, **114**, 1386-1390.

8.2.2. Resultados y discusión.

8.2.2.1. Extracción del aceite.

Los distintos porcentajes de extracción de los aceites obtenidos se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 25. Resultados obtenidos en las extracciones de pepitas y orujos de las distintas variedades estudiadas. Los resultados se presentan en tantos por ciento, como el valor medio de extracciones hechas por duplicado. También se indican las desviaciones estándar relativas obtenidas.

RENDIMIENTO EXTRACCIONES				
	PEPITAS	DSR	ORUJOS	DSR
Palomino	22,52	2,79	6,10	2,18
Pedro ximénez	22,32	3,26	6,71	3,14
Moscatel	14,74	5,39	3,81	3,79
Tempranillo	12,46	2,43	8,89	0,45
Tintilla de Rota	15,89	1,99	9,73	0,39

RENDIMIENTO EXTRACCIONES		
	ORUJOS	DSR
Tempranillo	8,73	8,30
Tintilla de Rota	10,29	5,14
Cabernet sauvignon	10,34	0,93
Petit verdot	8,17	2,33
Syrah	8,96	0,11

Como puede observarse, en el caso de las pepitas, las variedades palomino y pedro ximénez son las que mostraron tener un mayor contenido de aceite, diferenciándose claramente del resto de variedades. El rendimiento de extracción de los orujos fue muy inferior al de las pepitas, hecho que se esperaba ya que como es

sabido la mayor parte del contenido graso se encuentra en las semillas de la uva. Las extracciones de los orujos de las variedades tintas presentaron valores ligeramente superiores a los de las variedades blancas, destacando los porcentajes obtenidos para las variedades tintilla de Rota y cabernet sauvignon.

8.2.2.2. Contenido en ácidos grasos.

A continuación mostramos el perfil cromatográfico obtenido en los distintos análisis.

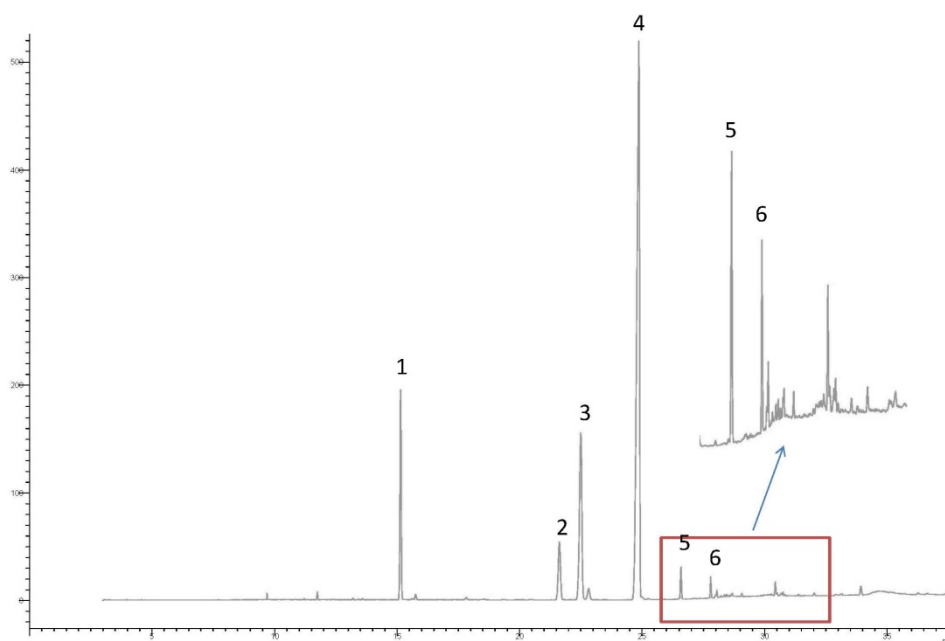


Figura 28. Perfil cromatográfico tipo obtenido en el análisis de ácidos grasos. (1) Ácido palmítico; (2) ácido esteárico; (3) ácido oleico; (4) ácido linoleico; (5) ácido linolénico; (6) ácido araquidónico.

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

El ácido graso mayoritario encontrado en todas las muestras analizadas fue el ácido linoleico, con valores medios hallados del 68,1% para el caso de los aceites de pepitas y del 63,9% para el de orujos. A éste le siguieron el ácido oleico y palmítico con porcentajes medios del 18,3% y 8,8% para los aceites de pepitas y del 17,3% y 10,9%, respectivamente, en los aceites de orujos. Finalmente, los últimos ácidos grasos a destacar en composición corresponden al ácido esteárico, linolénico y araquídico, cuyos porcentajes medios quedan representados en la *Figura 29*. Todos los porcentajes hallados son concordantes con los intervalos obtenidos por Crews y colaboradores³⁴ para muestras de aceites de pepitas de origen español, a excepción del obtenido para el ácido linolénico en los aceites de orujos que son algo superiores (1,8% frente al 0,6% obtenido como máximo en el trabajo citado).

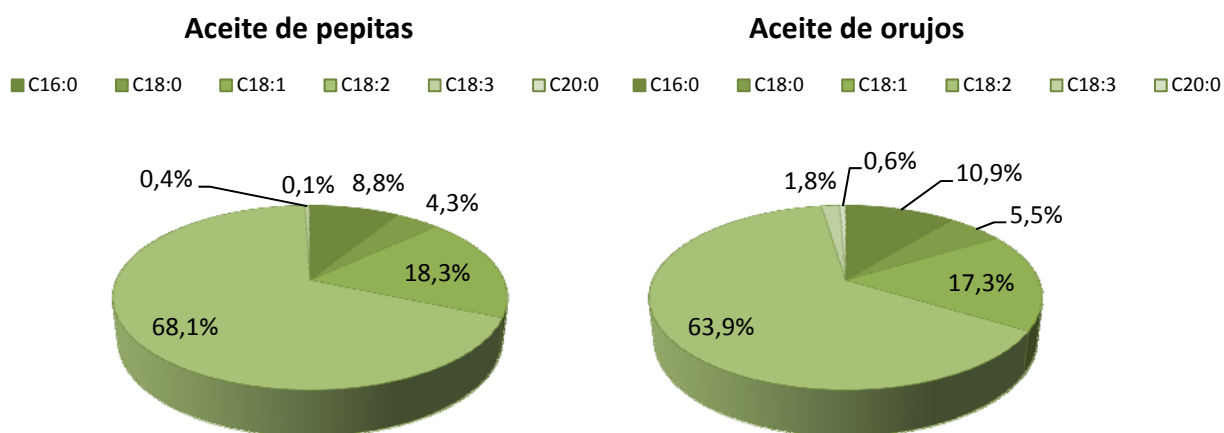


Figura 29. Representación de los porcentajes medios obtenidos para los distintos ácidos grasos determinados en los aceites de pepitas y aceites de orujos estudiados.

³⁴ Crews, C. et al., *J. Agric. Food Chem.*, 2006, **54**, 6261-6265.

El contenido medio de ácidos grasos insaturados en los aceites de pepitas corresponde al 86,8% mientras que para los aceites de orujos es del 83,1%. En la *Tabla 26* pueden observarse todos los resultados obtenidos para las distintas muestras.

En relación a los resultados obtenidos para el primer bloque de muestras estudiado, aceites de pepitas de distintas variedades blancas y tintas, se obtuvieron diferencias significativas para los distintos ácidos grasos, de forma independiente, con respecto a la variedad. Al comparar los resultados hallados para el contenido en ácidos grasos insaturados se obtiene, a partir de la Prueba de Múltiples Rangos de Fisher, una distribución de cuatro grupos homogéneos en los que la variedad moscatel aparece en el de mayores porcentajes y la palomino en el de menos concentración. No aparecen diferencias entre variedades blancas y tintas. Resultan significativas el gran número de correlaciones obtenidas entre los distintos ácidos grasos, en los que se establecen, para la mayoría de los casos, relaciones inversas entre los mismos ácidos grasos con distinto grado de insaturación.

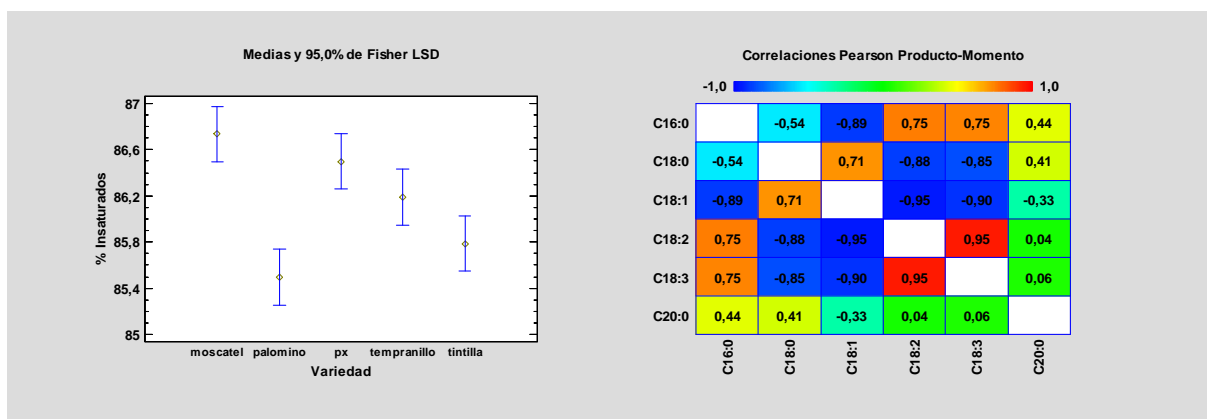


Figura 30. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para el % de ácidos grasos insaturados y matriz de correlación establecida para los distintos ácidos grasos de los aceites de pepitas estudiados.

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

Tabla 26. Resultados de la composición de ácidos grasos en tantos por cientos de los aceites estudiados; presentados como valores medios \pm desviación estándar.

		ÁCIDOS GRASOS						SUMA INSATURADOS
		C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	C20:0	
Pepitas	Palomino	8,30 \pm 0,17	5,23 \pm 0,12	19,62 \pm 0,20	65,55 \pm 0,50	0,33 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	85,50
	PX	8,15 \pm 0,10	4,39 \pm 0,05	20,13 \pm 0,10	66,01 \pm 0,07	0,35 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00	86,50
	Moscatel	8,66 \pm 0,16	3,65 \pm 0,02	17,56 \pm 0,06	68,74 \pm 0,09	0,43 \pm 0,03	0,12 \pm 0,01	86,74
	Tempranillo	8,97 \pm 0,08	4,02 \pm 0,11	16,75 \pm 0,38	69,00 \pm 0,52	0,44 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	86,19
	Tintilla de Rota	9,36 \pm 0,05	3,99 \pm 0,01	16,93 \pm 0,05	68,43 \pm 0,11	0,43 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	85,79
Orujos	Palomino	9,93 \pm 0,15	5,48 \pm 0,04	18,87 \pm 0,21	63,16 \pm 0,34	1,52 \pm 0,07	0,55 \pm 0,06	83,55
	PX	9,68 \pm 0,24	5,13 \pm 0,11	19,58 \pm 0,55	62,82 \pm 0,80	1,04 \pm 0,02	0,315 \pm 0,04	83,43
	Moscatel	10,79 \pm 0,38	4,74 \pm 0,04	16,32 \pm 0,01	61,37 \pm 0,37	4,03 \pm 0,01	0,81 \pm 0,03	81,72
	Tempranillo	11,56 \pm 0,14	4,59 \pm 0,08	16,04 \pm 0,11	64,34 \pm 0,14	1,69 \pm 0,02	0,42 \pm 0,02	82,07
	Tintilla de Rota	10,89 \pm 0,32	4,52 \pm 0,13	16,41 \pm 0,20	65,16 \pm 0,17	1,70 \pm 0,03	0,40 \pm 0,01	83,28
		ÁCIDOS GRASOS						SUMA INSATURADOS
		C16:0	C18:0	C18:1n9c	C18:2n6c	C18:3n3	C20:0	
Orujos	Tempranillo	11,12 \pm 1,10	4,60 \pm 0,16	14,32 \pm 0,33	67,03 \pm 0,67	1,17 \pm 0,00	0,55 \pm 0,07	82,53
	Tintilla de Rota	12,09 \pm 0,52	6,84 \pm 0,04	18,02 \pm 0,04	59,59 \pm 0,25	1,43 \pm 0,00	0,74 \pm 0,06	79,04
	Cabernet sauvignon	10,06 \pm 0,86	6,92 \pm 0,17	16,97 \pm 0,49	63,11 \pm 0,75	1,44 \pm 0,04	0,58 \pm 0,00	81,52
	Petit verdot	11,58 \pm 0,03	6,50 \pm 0,12	15,87 \pm 0,05	60,81 \pm 0,16	1,98 \pm 0,00	0,82 \pm 0,13	78,66
	Syrah	10,35 \pm 0,3	5,10 \pm 0,08	20,20 \pm 0,28	61,39 \pm 1,03	1,55 \pm 0,03	0,44 \pm 0,04	83,14

Si nos fijamos en el segundo bloque de resultados, aceites de orujos de distintas variedades blancas y tintas, vuelven a aparecer diferencias estadísticamente significativas para todos y cada uno de los ácidos grasos individuales con respecto a la variedad. En lo que se refiere al porcentaje de ácidos grasos insaturados, la Prueba de Múltiples Rangos nos muestra dos grupos homogéneos en los que las variedades palomino, pedro ximénez, y tintilla de Rota componen el grupo de mayor porcentaje en insaturados. Hay que destacar que estas variedades son distintas a las obtenidas para los aceites de pepitas. No se establecen diferencias en la composición en ácidos grasos insaturados entre variedades blancas y tintas. Como mostramos en la *Figura 31*,

no se obtienen coeficientes de correlación tan elevados como en el caso del aceite de pepita.

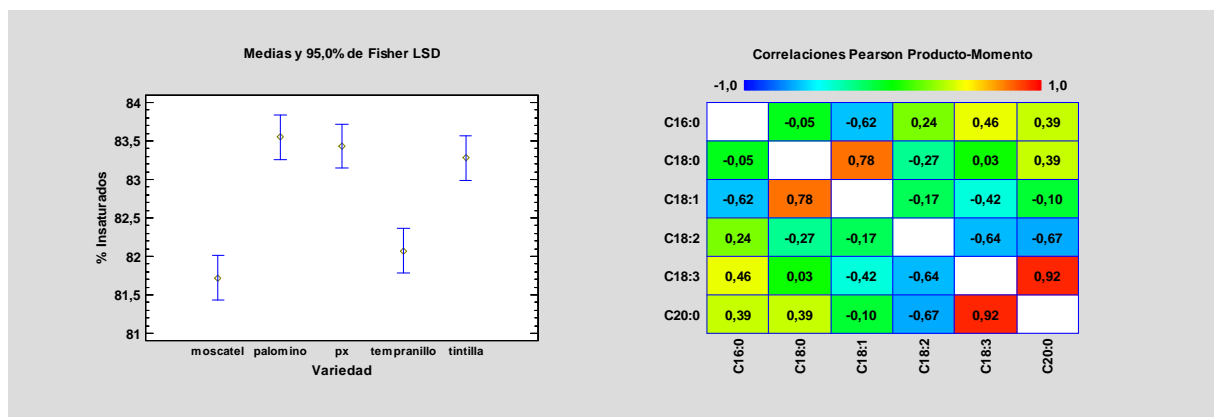


Figura 31. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para el % de ácidos grasos insaturados y matriz de correlación establecida para los distintos ácidos grasos de aceites de orujos.

Si comparamos los resultados de los aceites de pepita y aceites de orujos de las mismas variedades se observan diferencias en cuanto a la composición. Mientras que el aceite de pepita es ligeramente más rico en ácido oleico y linoleico, el de orujo lo es en ácido linolénico. El contenido total de ácidos grasos insaturados es algo superior para los aceites de pepitas si bien hay que tener en consideración que estas diferencias apenas rozan el 5% en el mayor de los casos. Por consiguiente, resulta obvio que la presencia del orujo en el proceso de extracción del aceite modifica algo la composición del mismo, proporcionando un aceite con un porcentaje algo inferior en ácidos grasos insaturados de manera general, pero con un mayor contenido en ácido linolénico de manera particular.

Atendiendo a los resultados obtenidos para el grupo de aceites de orujos de las distintas variedades tintas, vuelven a aparecer diferencias entre las distintas variedades. Son las variedades tempranillo, cabernet sauvignon y syrah las que muestran un mayor contenido en ácidos grasos insaturados. Al comparar los

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

resultados obtenidos para los aceites de orujos de tempranillo y tintilla de Rota en las dos vendimias estudiadas, no se encuentran diferencias estadísticamente significativas entre ambas vendimias.

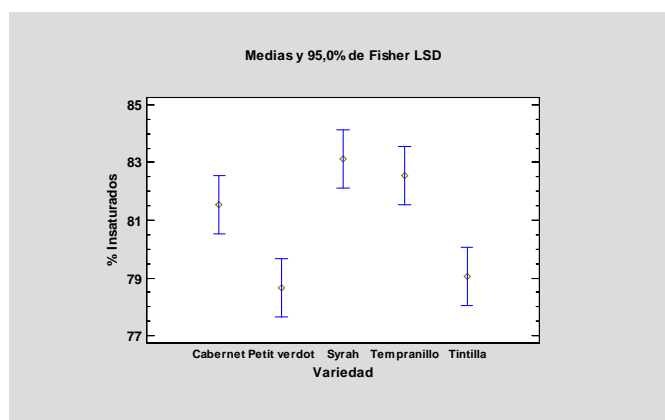


Figura 32. Representación gráfico de medias y test LSD de Fisher para el % de ácidos grasos insaturados de los aceites de orujos de variedades tintas.

8.2.2.3. Contenido en tocoferoles.

Se lograron detectar tres isómeros de tocoferol en las muestras analizadas: α -tocoferol, γ -tocoferol y δ -tocoferol. El isómero β -tocoferol no fue hallado en ninguna de las muestras. La identificación de los tocoferoles se realizó a partir de los tiempos de retención obtenidos para sus patrones y la cuantificación por medio de sus correspondientes rectas de calibrado. En la tabla contigua mostramos los intervalos de concentración así como los valores medios de R^2 , límites de detección y cuantificación obtenidos de los calibrados realizados.

Tabla 27. Datos medios de calibración. Las concentraciones y límites están expresados en ppm.

PATRÓN	RANGO CONCENTRACIÓN	R ²	LOD	LOQ
α- Tocoferol	0,1 - 15	0,9991	0,177	0,592
γ- Tocoferol	0,02 - 5	0,9980	0,018	0,060
δ- Tocoferol	0,02 - 2,5	0,9995	0,025	0,082

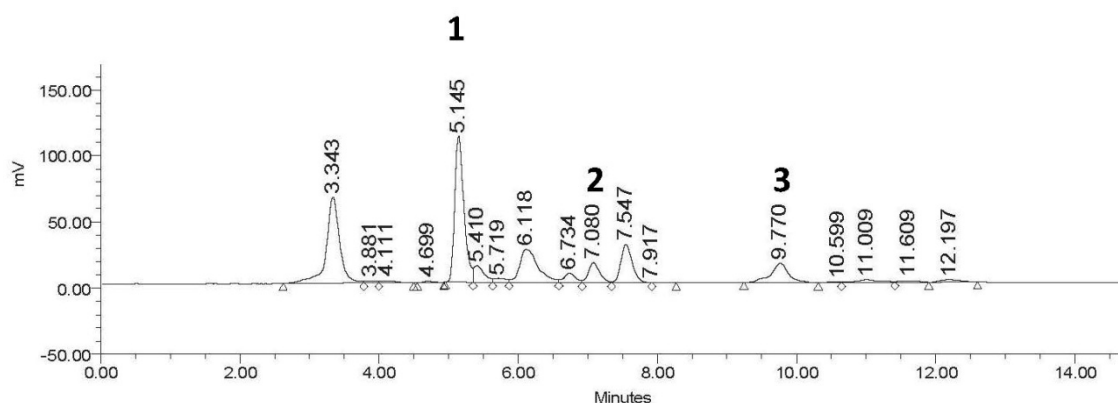


Figura 33. Perfil cromatográfico obtenido en la determinación de tocoferoles.

Para los aceites de pepitas de las distintas variedades blancas y tintas, las cantidades de tocoferoles totales cuantificadas van desde 19,6 a 24,8 mg / 100 g de aceite, tal y como puede observarse en la *Tabla 28* de resultados. El tocoferol mayoritario fue el isómero α-tocoferol, del que se obtuvo una media del 73,6% del contenido total. A este le siguió el isómero γ-tocoferol con un 23,6% del total y el δ-tocoferol con un 2,8%. En las muestras de pedro ximénez y moscatel no se detectó δ-tocoferol. Casi no existen diferencias entre los resultados de tocoferoles totales obtenidos para los aceites de pepitas de las distintas variedades, pudiéndose establecer diferencias estadísticamente significativas sólo entre los resultados de la

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

variedad palomino, con el contenido más alto, y moscatel, que mostró tener el contenido más bajo.

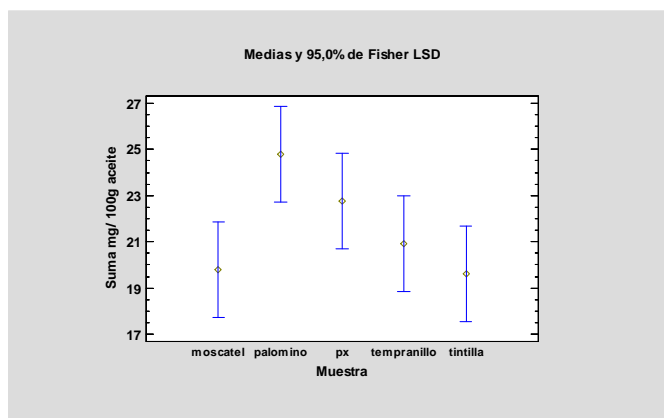


Figura 34. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para el contenido total de tocoferoles en aceites de pepitas.

Respecto a los aceites de orujos, las cantidades de tocoferoles totales halladas fueron de 22,9 – 168,6 mg / 100 g de aceites. Los porcentajes obtenidos de los distintos isómeros fueron: 83,9% α -tocoferol; 10,5% γ -tocoferol y 5,6% δ -tocoferol. Encontramos diferencias significativas entre las distintas variedades de aceites de orujos. El aceite de orujo de la variedad palomino es el que mostró, con gran diferencia, un mayor contenido de tocoferoles. Cabe destacar también las cantidades obtenidas para las variedades tintas.

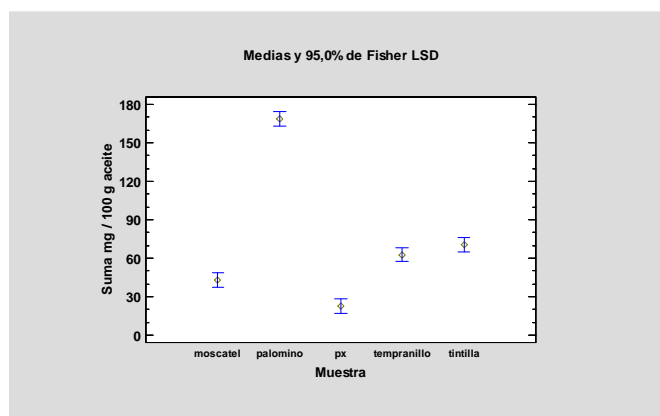


Figura 35. Gráfico de medias y test LSD de Fisher para el contenido total de tocoferoles en aceites de orujos.

Al comparar los resultados de los aceites de pepitas con los de orujos de las mismas variedades, se observan grandes diferencias tanto en cantidad como en composición. Las cantidades totales de tocoferoles obtenidos en los aceites de orujos son mucho mayores que en los aceites de pepitas, a excepción de los aceites de pedro ximénez, en cuyo caso los resultados son equiparables (*Figura 36*). El aceite de orujo de palomino es casi siete veces más rico en tocoferoles que el de pepitas de la misma variedad. Los aceites de orujos de tintas triplican su contenido con respecto a sus análogos de pepitas. Resulta revelador que la mayor diferencia se halle en los aceites de la variedad palomino, ya que el orujo de palomino es el único que contenía el raspón. Éste hecho unido a que sean los aceites de orujos de tintas los segundos en mayores diferencias, nos hace pensar que estos resultados pueden estar relacionados con el contenido polifenólico que presentan los orujos. El contenido polifenólico de los orujos puede estar ejerciendo un efecto de protección frente a la oxidación de los tocoferoles durante el proceso de extracción de los aceites. En la *Figura 37* se muestran las diferencias en composición entre los distintos aceites. Los aceites de orujos muestran de forma general, tanto en contenido relativo como absoluto, una mayor cantidad de α y δ -tocoferol.

Tabla 28. Resultados de tocoferoles obtenidos en las muestras estudiadas, expresados como el valor medio \pm desviación estándar. N.D.: no detectado.

		TOCOFEROLES							
		mg α -T / 100 g aceite	mg α -T / Kg Subproducto	mg γ -T / 100 g aceite	mg γ -T / Kg Subproducto	mg δ -T / 100 g aceite	mg δ -T / Kg Subproducto	Suma mg T / 100 g aceite	Suma mg T / Kg Subproducto
Pepitas	Palomino	19,31 \pm 0,14	43,56 \pm 15,45	4,47 \pm 0,08	10,10 \pm 3,68	1,02 \pm 0,05	2,31 \pm 0,90	24,80	55,96
	PX	18,89 \pm 0,54	42,14 \pm 0,17	3,86 \pm 0,24	8,61 \pm 0,26	N.D.	N.D.	22,75	50,75
	Moscatel	17,24 \pm 1,73	25,33 \pm 1,19	2,56 \pm 0,03	3,77 \pm 0,16	N.D.	N.D.	19,80	29,10
	Tempranillo	12,51 \pm 1,23	15,56 \pm 1,16	7,21 \pm 0,80	8,97 \pm 0,78	1,19 \pm 0,10	1,48 \pm 0,16	20,91	26,01
	Tintilla de Rota	11,48 \pm 1,23	18,22 \pm 1,60	7,33 \pm 1,03	11,64 \pm 1,41	0,81 \pm 0,08	1,28 \pm 0,10	19,62	31,14
Orujos	Palomino	157,01 \pm 7,37	95,85 \pm 6,59	3,73 \pm 0,07	2,27 \pm 0,09	7,91 \pm 0,31	4,82 \pm 0,08	168,64	102,94
	PX	17,91 \pm 1,16	12,03 \pm 1,16	3,50 \pm 0,30	2,35 \pm 0,28	1,48 \pm 0,23	0,99 \pm 0,12	22,89	15,38
	Moscatel	36,78 \pm 5,66	13,98 \pm 1,63	1,95 \pm 0,07	0,74 \pm 0,00	4,16 \pm 0,44	1,58 \pm 0,11	42,89	16,31
	Tempranillo	54,35 \pm 1,82	48,17 \pm 1,60	6,18 \pm 0,27	5,48 \pm 0,24	2,29 \pm 0,05	2,03 \pm 0,04	62,82	55,67
	Tintilla de Rota	64,74 \pm 0,56	62,99 \pm 0,30	3,73 \pm 0,18	3,63 \pm 0,19	2,19 \pm 0,02	2,13 \pm 0,03	70,66	68,75
		TOCOFEROLES							
		mg α -T / 100 g aceite	mg α -T / Kg Subproducto	mg γ -T / 100 g aceite	mg γ -T / Kg Subproducto	mg δ -T / 100 g aceite	mg δ -T / Kg Subproducto	Suma mg T / 100 g aceite	Suma mg T / Kg Subproducto
Orujos	Tempranillo	53,73 \pm 2,42	46,99 \pm 6,01	2,88 \pm 0,18	2,52 \pm 0,37	8,64 \pm 0,38	7,56 \pm 0,96	65,26	57,07
	Tintilla de Rota	55,29 \pm 3,39	56,65 \pm 5,13	4,80 \pm 0,32	4,97 \pm 1,08	2,11 \pm 0,04	2,18 \pm 0,37	62,21	63,80
	Cabernet Sauvignon	33,84 \pm 5,11	44,57 \pm 6,00	3,53 \pm 0,26	4,65 \pm 0,26	3,97 \pm 0,58	5,22 \pm 0,67	41,34	54,44
	Petit verdot	121,36 \pm 9,87	137,40 \pm 24,15	53,98 \pm 1,23	60,94 \pm 7,18	6,52 \pm 0,26	7,37 \pm 0,99	181,86	205,71
	Syrah	64,81 \pm 1,63	91,46 \pm 1,34	1,84 \pm 0,00	2,60 \pm 0,03	N.D.	N.D.	66,65	94,05

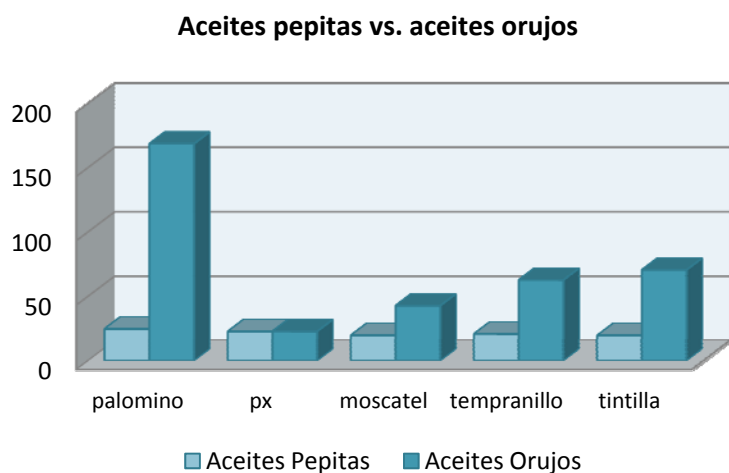


Figura 36. Representación gráfica de los contenidos medios de tocoferoles totales obtenidos para los aceites de orujos y pepitas analizados.

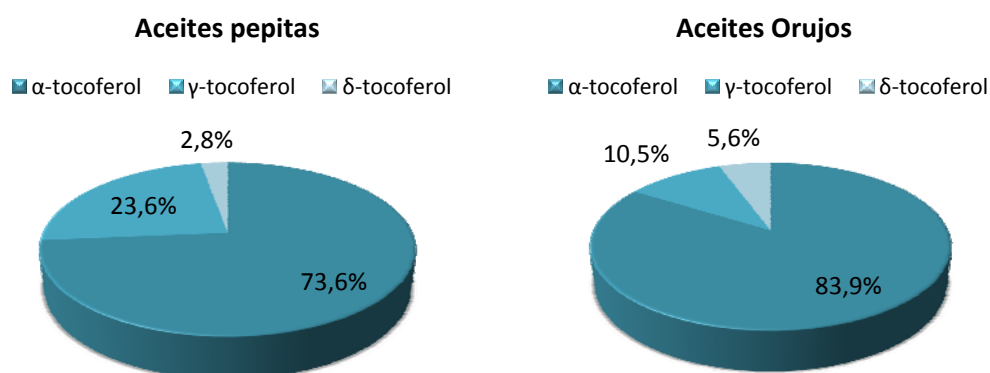


Figura 37. Representación gráfica de los porcentajes relativos medios de las distintas formas de tocoferol obtenidas en los aceites de pepitas y aceites de orujos estudiados.

En cuanto a los resultados obtenidos para los aceites de orujos de las variedades tintas analizadas, se obtuvieron cantidades de tocoferoles totales que van desde 41,3 a 181,9 mg / 100 g de aceite. Se siguió manteniendo el α -tocopherol como el

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

isómero mayoritario. Las muestras de syrah fueron las únicas que no presentaron δ -tocoferol. Los aceites de orujo de la variedad petit verdot se alejaron totalmente del resto de variedades tintas y mostraron tener un contenido en tocoferoles totales muy superior a los demás. Los aceites de orujo de la variedad cabernet se diferenciaron como los de menor contenido mientras que entre el resto de variedades no se pudieron establecer diferencias para los resultados totales con significancia estadística.

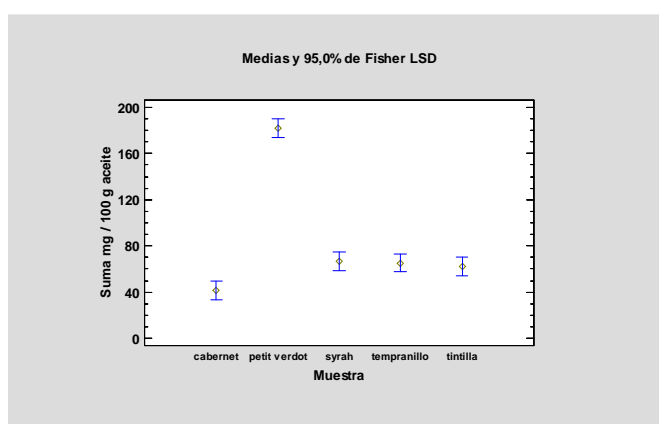


Figura 38. Representación gráfico de medias y test LSD Fisher para el contenido en tocoferoles totales de los aceites de orujos de las variedades tintas analizadas.

Si comparamos los resultados en tocoferoles totales obtenidos para los aceites de orujos de tempranillo y tintilla de Rota de las dos vendimias en las que se estudiaron, no se encuentran diferencias significativas entre los resultados con respecto a la vendimia.

8.2.3. Conclusiones.

- Los aceites de pepitas de variedades cultivadas en Andalucía muestran un alto contenido en ácidos grasos insaturados, con valores medios del 86,8% del contenido. Están fundamentalmente compuestos de ácido linoléico y oléico con un 68,1% y 18,3% medios respectivamente. El contenido medio en tocoferoles es de 21,6 mg / 100 g de aceite, siendo el 73,6% α -tocoferol. Aunque se puede destacar el aceite de pepita de moscatel como el de mayor contenido en ácidos grasos insaturados y el de palomino por su contenido total en tocoferoles, atendiendo a ambos parámetros no podríamos seleccionar ninguno como más adecuado. Todas las variedades estudiadas resultarían muy favorables para obtener aceites a partir de sus pepitas.
- Por su parte, los aceites de orujos presentaron contenidos en ácidos grasos del mismo orden al de los aceites de pepitas. Aunque los contenidos en ácidos grasos insaturados fueron algo menores a los obtenidos para los aceites de pepitas, los porcentajes en ácidos linolénico, el ácido graso con mayor número de insaturaciones obtenido, fueron superiores. Los aceites de orujos muestran contenidos en tocoferoles muy superiores a los aceites de pepitas. Esto puede deberse a que el contenido polifenólico del orujo ejerza un efecto de protección frente a la posible oxidación de los tocoferoles durante el proceso de extracción de los aceites. Destacamos en base a los resultados obtenidos las variedades de aceites de orujos de tintas y de palomino siempre que incluya el raspón.
- En relación a los aceites de orujos de las distintas variedades tintas estudiadas, hay que destacar expresamente el de la variedad petit

verdot por presentar cantidades de tocoferoles muy superiores al resto y el de tempranillo como el más equilibrado en cuanto a ácidos grasos insaturados y tocoferoles totales.

- La extracción del aceite del orujo completo se presenta como una alternativa viable a la extracción de la pepita. Aunque encontramos el inconveniente de que los rendimientos de extracción de los aceites por kilogramo de subproducto tratado son menores, este hecho queda compensado al conseguir: por un lado evitar la etapa de separación de la pepita del resto del orujo y por el otro, obtener un aceite de características diferenciadas con un contenido mucho más elevado en vitamina E.

8.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Adhikari, P., Hwang, K. T., Shin, M. K., Lee, B. K., Kim, S. K., Kim, S. Y., Lee, K., & Kim, S. Z. (2008). Tocols in caneberry seed oils. *Food Chemistry*, 111(3), 687-690.
- Agostini, F., Bertussi, R. A., Agostini, G., Atti Dos Santos, A. C., Rossato, M., & Vanderlinde, R. (2012). Supercritical extraction from vinification residues: Fatty acids, α -tocopherol, and phenolic compounds in the oil seeds from different varieties of grape. *The Scientific World Journal*, 2012, Article ID 790486.
- Bail, S., Stuebiger, G., Krist, S., Unterweger, H., & Buchbauer, G. (2008). Characterisation of various grape seed oils by volatile compounds, triacylglycerol composition, total phenols and antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 108, 1122–1132.
- Choi, Y., & Lee, J. (2009). Antioxidant and antiproliferative properties of a tocotrienol-rich fraction from grape seeds. *Food Chemistry*, 114(4), 1386-1390.
- Choi, Y., Jeong, H., & Lee, J. (2007). Antioxidant activity of methanolic extracts from some grains consumed in Korea. *Food Chemistry*, 103(1), 130-138.
- Crews, C., Hough, P., Godward, J., Brereton, P., Lees, M., Guet, S., & Winkelmann, W. (2006). Quantitation of the main constituents of some authentic grape-seed oils of different origin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(17), 6261-6265.
- Della Corte, A., Chitarrini, G., Di Gangi, I. M., Masuero, D., Soini, E., Mattivi, F., & Vrhovsek, U. (2015). A rapid LC–MS/MS method for quantitative profiling of fatty acids, sterols, glycerolipids, glycerophospholipids and sphingolipids in grapes. *Talanta*, 140, 52–61.
- Dos Santos Freitas, L., Jacques, R. A., Richter, M. F., Silva, A. L. d., & Caramão, E. B. (2008). Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *Journal of Chromatography A*, 1200(1), 80-83.
- Fernandes, L., Casal, S., Cruz, R., Pereira, J. A., & Ramalhosa, E. (2013). Seed oils of ten traditional Portuguese grape varieties with interesting chemical and antioxidant properties. *Food Research International*, 50(1), 161-166.
- Fiori, L., Lavelli, V., Duba, K. S., Sri Harsha, P. S. C., Mohamed, H. B., & Guella, G. (2014). Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. *Journal of Supercritical Fluids*, 94, 71–80.
- Gómez, M. E., Igartuburu, J. M., Pando, E., Rodríguez Luis, F., & Mourente, G. (2004). Lipid composition of lees from Sherry wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4791–4794.

8. Caracterización del aceite de orujos y pepitas

- Górnas, P., Siger, A., & Seglina, D. (2013). Physicochemical characteristics of the cold-pressed Japanese quince seed oil: New promising unconventional bio-oil from by-products for the pharmaceutical and cosmetic industry. *Industrial Crops and Products*, 48, 178-182.
- Górnaś, P., Soliven, A., & Segliņa, D. (2015). Seed oils recovered from industrial fruit by-products are a rich source of tocopherols and tocotrienols: Rapid separation of $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ homologues by RP-HPLC/FLD. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 117(6), 773-777.
- Gliszczynska-Swiglo, A., & Sikorska, E. (2004). Simple reversed-phase liquid chromatography method for determination of tocopherols in edible plant oils. *Journal of Chromatography A*, 1048(2), 195-198.
- Hassanein, M. M., & Abedel-Razek, A. G. (2009). Chromatographic quantitation of some bioactive minor components in oils of wheat germ and grape seeds produced as by-products. *Journal of oleo science*, 58(5), 227-233.
- Hidalgo Togores, J. *Tratado de Enología*. 2ª Ed. Madrid-México: Ediciones Mundi-Prensa, 2011.
- Kamal-Eldin, A., Görgen, S., Pettersson, J., & Lampi, A. -. (2000). Normal-phase high-performance liquid chromatography of tocopherols and tocotrienols - Comparison of different chromatographic columns. *Journal of Chromatography A*, 881(1-2), 217-227.
- Khanna, S., Roy, S., Ryu, H., Bahadduri, P., Swaan, P. W., Ratan, R. R., & Sent, C. K. (2003). Molecular Basis of Vitamin E Action: Tocotrienol modulates 12-lipoxygenase, a key mediator of glutamate-induced neurodegeneration. *Journal of Biological Chemistry*, 278(44), 43508-43515.
- Kim, H., Kim, S., Choi, Y., Jeong, H., & Lee, J. (2008). Changes in tocopherols, tocotrienols, and fatty acid contents in grape seed oils during oxidation. *JAOCs, Journal of the American Oil Chemists' Society*, 85(5), 487-489.
- Lachman, J., Hejtmánková, A., Táborský, J., Kotíková, Z., Pivec, V., Střalková, R., Dědina, M. (2015). Evaluation of oil content and fatty acid composition in the seed of grapevine varieties. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1), 620-625.
- Lim, H., Woo, S., Hong, S. K., Jong, S., & Lee, J. (2007). Comparison of extraction methods for determining tocopherols in soybeans. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 109(11), 1124-1127.
- Luque-Rodríguez, J. M., Luque de Castro, M. D., & Pérez-Juan, P. (2005). Extraction of fatty acids from grape seed by superheated hexane. *Talanta*, 68(1), 126-30.
- Lutterodt, H., Slavin, M., Whent, M., Turner, E., & Yu, L. (2011). Fatty acid composition, oxidative stability, antioxidant and antiproliferative properties of selected cold-pressed grape seed oils and flours. *Food Chemistry*, 128(2), 391-399.
- Oomah, B. D., Liang, J., Godfrey, D., & Mazza, G. (1998). Microwave Heating of Grapeseed: Effect on Oil Quality. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46(10), 4017-4021.

- Pardo, J. E., Fernández, E., Rubio, M., Alvarruiz, A., & Alonso, G. L. (2009). Characterization of grape seed oil from different grape varieties (*Vitis vinifera*). *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(2), 188–193.
- Pinheiro-Sant'Ana, H. M., Guinazi, M., Oliveira, D. D. S., Della Lucia, C. M., Reis, B. D. L., & Brandão, S. C. (2011). Method for simultaneous analysis of eight vitamin E isomers in various foods by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 1218(47), 8496–8502.
- Qureshi, A. A., Mo, H., Packer, L., & Peterson, D. M. (2000). Isolation and identification of novel tocotrienols from rice bran with hypocholesterolemic, antioxidant, and antitumor properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(8), 3130–3140.
- Rombaut, N., Savoie, R., Thomasset, B., Bélliard, T., Castello, J., Van Hecke, É., & Lanoisellé, J. L. (2014). Grape seed oil extraction: Interest of supercritical fluid extraction and gas-assisted mechanical extraction for enhancing polyphenol co-extraction in oil. *Comptes Rendus Chimie*, 17(3), 284–292.
- Rupérez, F. J., Martín, D., Herrera, E., & Barbas, C. (2001). Chromatographic analysis of α -tocopherol and related compounds in various matrices. *Journal of Chromatography A*, 935(1-2), 45–69.
- Ryyänänen, M., Lampi, A., Salo-Väänänen, P., Ollilainen, V., & Piironen, V. (2004). A small-scale sample preparation method with HPLC analysis for determination of tocopherols and tocotrienols in cereals. *Journal of Food Composition and Analysis*, 17(6), 749–765.
- Sabir, A., Unver, A., & Kara, Z. (2012). The fatty acid and tocopherol constituents of the seed oil extracted from 21 grape varieties (*Vitis* spp.). *Journal of the science of food and agriculture*, 92(9), 1982–1987.
- Schwartz, H., Ollilainen, V., Piironen, V., & Lampi, A. -. (2008). Tocopherol, tocotrienol and plant sterol contents of vegetable oils and industrial fats. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21(2), 152–161.
- Seker, M. E., Çelik, A., & Dost, K. (2012). Determination of vitamin E isomers of grape seeds by high-performance liquid chromatography-UV detection. *Journal of chromatographic science*, 50(2), 97–101.
- Traber, M. G., & Sies, H. (1996). Vitamin E in humans: Demand and delivery. *Annual Review of Nutrition*, 16, 321–347.
- Wie, M., Sung, J., Choi, Y., Kim, Y., Jeong, H., & Lee, J. (2009). Tocopherols and tocotrienols in grape seeds from 14 cultivars grown in Korea. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(12), 1255–1258.

**CAPÍTULO 9. ESTUDIO DE LA VIABILIDAD DEL
PROCESO DE DESHIDRATACIÓN POR SECADO
EN CÁMARA CLIMÁTICA COMO MÉTODO
PARA LA CONSERVACIÓN DE LOS ORUJOS**

9.1. INTRODUCCIÓN.

Los orujos son altamente susceptibles a procesos de degradación por actividad microbiana debido al grado de humedad remanente que contienen. De manera general, en todos los trabajos de investigación bibliográficamente consultados, se suelen congelar las muestras de subproductos hasta su utilización. Sin embargo, si se plantea su utilización a nivel industrial, la congelación puede ser un procedimiento no viable por los grandes volúmenes de materia involucrados. Una de las formas más antiguas de conservación y procesado de los alimentos es por secado¹, de manera que reitrando el agua se protege el alimento frente a la degradación microbiana a la par que se disminuye la actividad de algunas enzimas oxidativas.

La conservación de los subproductos, unido a su posible utilización como ingredientes nutraceuticos, en los que los subproductos habrían de someterse al proceso de elaboración del alimento, habitualmente calentamiento, ha dado lugar a que se hayan realizado diversos estudios en los que se ha evaluado como afecta la temperatura o el proceso de secado a orujos y pepitas de uvas. Fundamentalmente se ha estudiado su efecto sobre el contenido polifenólico por la importante bioactividad de estos compuestos y su labilidad. En relación al proceso de deshidratación, la liofilización se muestra como uno de los procesos que menos modifica el estado inicial de la muestra, pero que a su vez es uno de los procedimientos de mayor requerimiento económico, mientras que el secado por aire caliente se plantea como un método mucho menos costoso pero de resultados variables en función de la temperatura².

Los estudios que tratan de dilucidar como afecta la temperatura a las muestras de subproductos vitivinícolas han dado lugar a resultados y conclusiones, en muchos

¹ Ratti, C., *J. Food Eng.*, 2001, **49**, 311–319.

² Tseng, A. and Zhao, Y., *J. Food Sci.*, 2012, **77**, H192–H201.

de los casos, contradictorias. Existen autores que confirman que la aplicación de temperaturas por debajo de 60 °C no modifica el contenido polifenólico, pero temperaturas superiores lo disminuyen significativamente^{3,4,5,6}. Sin embargo, Rajha y colaboradores (2014)⁷ obtuvieron disminuciones en el contenido polifenólico incluso secando a 45 °C. Por su parte, otros autores han llegado a la conclusión de que la aplicación de tratamientos térmicos, siempre y cuando no se realicen durante largos períodos de tiempos, pueden aumentar el contenido polifenólico del proceso de extracción^{8,9,10}. Hartley, Morrison, Himmelsbach and Borneman (1990) sugirieron que como los polifenoles pueden estar unidos a carbohidratos y proteínas, procesos térmicos a altas temperaturas pueden romper estos enlaces favoreciendo la extracción de estos compuestos¹¹. Sin embargo, Kim y colaboradores¹⁰ obtuvieron un aumento en el contenido polifenólico y actividad antioxidante de extractos de pepitas de uvas incluso tratándolas a 50 °C.

Según lo que acabamos de relatar, resulta evidente que se necesita un mayor estudio en este campo para esclarecer los controvertidos resultados obtenidos hasta el momento. De igual forma, buscar métodos alternativos de secado para los residuos vitivinícolas a gran escala puede resultar muy ventajoso. A partir de estas consideraciones, nos planteamos la posible utilización de una cámara climática para el secado de los subproductos vitivinícolas. Hasta el momento, los estudios relacionados con el uso de cámaras climáticas enfocados a la enología, han estado relacionados con

³ Khanal, R. C. *et al.*, *Food Res. Int.*, 2010, **43**, 1464–1469.

⁴ Sólyom, K. *et al.*, *Food Chem.*, 2014, **159**, 361–366.

⁵ Larrauri, J. A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 1997, **45**, 1390–1393.

⁶ Vashisth, T. *et al.*, *LWT - Food Sci. Technol.*, 2011, **44**, 1649–1657.

⁷ Rajha, H. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 18640–18658.

⁸ Chamorro, S. *et al.*, *Eur. Food Res. Technol.*, 2011, **234**, 147–155.

⁹ Chang, C.H. *et al.*, *J. Food Eng.*, 2006, **77**, 478–485.

¹⁰ Kim, S.Y. *et al.*, *Food Chem.*, 2006, **97**, 472–479.

¹¹ Hartley, M. W. H. *et al.*, *Phytochemistry*, 1990, **29**, 3705–3709.

su utilización como alternativa para la pasificación de uva de forma controlada, a temperatura y % humedad constante¹².

Márquez y colaboradores (2013)¹³ demostraron que al pasificar uva tinta de las variedades tempranillo, merlot y syrah, cultivadas en el sur de España, en una cámara climática a 40 °C, se produce tras las primeras 24 horas un aumento en el contenido polifenólico total y antocianinas de la uva de entre 3 y 4 veces el inicial, que relacionan con una mayor extractabilidad de estos compuestos por las alteraciones que el calor produce en la piel de la uva. Tras las primeras 24 horas el contenido polifenólico sigue aumentado ligeramente pero el de antocianinas comienza a disminuir. Estos mismos autores¹⁴ consideran que las alteraciones y el aumento en la permeabilidad de la piel de la uva pueden deberse a la activación de ciertas enzimas durante el proceso de secado como las lipooxigenasas.

De acuerdo a lo anterior, realizamos un estudio en el que procedimos secando los orujos, de las variedades tintas estudiadas en esta tesis (tempranillo, tintilla de Rota, cabernet sauvignon, petit verdot y syrah), en una cámara climática. Se estudió el contenido polifenólico y el poder antioxidante de los extractos obtenidos a partir de los orujos secos y sus homólogos húmedos, a fin de conocer las posibles modificaciones resultantes del secado bajo las condiciones seleccionadas.

¹² Ruíz Bejarano, M. J. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2010, **58**, 13006–13012.

¹³ Marquez, A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 9908–9914.

¹⁴ Marquez, A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2012, **60**, 6866–6874.

9.2. ESTUDIO DEL PROCESO DE SECADO.

9.2.1. Materiales y métodos.

9.2.1.1. Muestras.

Las muestras utilizadas en este estudio fueron orujos de vinificación de cinco variedades tintas, tempranillo, tintilla de Rota, cabernet sauvignon, petit verdot y syrah, vinificadas en el CAIV siguiendo el protocolo ya indicado en el apartado 3.2, sin ningún tipo de tratamiento previo (los llamaremos orujo húmedo para diferenciarlo) y tras un proceso de secado (orujo seco), por lo que en total son 10 las muestras estudiadas: cinco orujos húmedos y cinco orujos secos.

9.2.1.2. Reactivos y disolventes.

Los reactivos y disolventes empleados en este estudio son los descritos en los capítulos 3, 5 y 8, relacionados con el procedimiento de extracción, determinación de polifenoles y actividad antioxidante, respectivamente.

9.2.1.3. Metodología.

El secado de los orujos se realizó en una cámara climática de la casa Ibercex, a 40 °C, 10% de humedad relativa y oscuridad. Se comprobó el tiempo necesario para el secado de los orujos, concluyéndose que la pérdida de peso permanecía constante tras 24 horas de secado. Tanto las muestras secas como húmedas fueron trituradas en un robot de cocina convencional y



tamizadas para adquirir un tamaño de partícula homogéneo de entre 100 – 300 micras. A continuación, se procedió a realizar las extracciones y las determinaciones de acuerdo a los protocolos descritos anteriormente. Se determinó el contenido en polifenoles, antocianos y taninos totales. Se estudió también su contenido en flavanoles, flavonoles y antocianinas individuales, así como la actividad antioxidante.

9.2.1.4. Tratamiento estadístico.

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado y los resultados se han presentado como la media \pm la desviación estándar (DS). Se llevo a cabo un estudio comparativo de los resultados a través del análisis de las varianzas (ANOVA) de un factor, considerándose como criterio de significancia estadística $p < 0,05$. Todos los resultados fueron procesados mediante el software *Statgraphic Centurion XVII*.

9.2.2. Resultados y discusión.

La pérdida de peso durante el proceso de secado es uno de los factores a tener en cuenta en la evaluación de los resultados obtenidos, ya que incide directamente en el contenido final absoluto de los analitos estudiados, al implicar, como mínimo, un aumento de sus niveles por concentración, sin considerar otros procesos que tengan lugar durante el secado que suponga una alteración de la concentración inicial de los mismos.

Como se puede ver en la *Tabla 29* la pérdida de peso de las muestras estudiadas durante el proceso de secado está en torno al 20%, siendo los orujos de la variedad cabernet sauvignon los que presentan un mayor contenido en agua (23%). En líneas generales este dato, aunque orientativo del estado físico de las muestras, no es un dato muy representativo de las mismas, ya que el grado de humedad de este tipo

de muestra está íntimamente ligado, además de a la variedad, a la procedencia geográfica de la uva, las condiciones climáticas de la vendimia, y a las tareas enológicas que se realicen en la bodega durante el proceso de elaboración del vino, y más concretamente a las tareas de descube y prensado de los orujos, al tratarse todas ellas de variedades tintas. En nuestro caso todas las muestras procedían de la misma finca y se procesaron de igual forma, incluso por el mismo personal, de forma de que se ha intentado paliar aquellos factores que eran controlables por nosotros; en este caso podemos considerar que la principal causa de variabilidad en la humedad de los orujos se puede deber principalmente a la naturaleza de las muestras estudiadas, incluyendo, la propia variabilidad de la variedad a las condiciones climáticas de la vendimia.

Tabla 29. Datos del proceso de secado de orujos.

	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH
PESO INICIAL (g de orujo)	1929	1963	1957	1947	1949
PESO FINAL TRAS SECADO (g de orujo)	1577	1575	1510	1577	1572
PÉDIDA DE PESO (%)	18	20	23	19	19

Los orujos estudiados presentan un contenido medio de polifenoles totales de 14,70 mg GAE / g de orujo (*Tabla 30*), presentando todos ellos valores muy próximos entre si, comprendidos entre los 13,73 mg GAE / g de orujo de la variedad Syrah, y los 16,38 mg GAE / g de orujo de la variedad tempranillo. El análisis de la varianza de un factor realizado sobre este parámetro indica que todas las muestras son similares, a excepción de los orujos de tempranillo, para un nivel de confianza del 95%, aplicando como método para discriminar entre las medias el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. En cuanto al contenido en antocianos totales, los orujos son más heterogéneos, los orujos de cabernet sauvignon presentan los valores más

9. Estudio de la viabilidad del proceso de deshidratación por secado en cámara...

bajos (0,61 mg malvidina / g de orujo) y los de petit verdot los más altos (2,34 mg malvidina / g de orujo), estando el contenido medio en 1,55 mg malvidina / g de orujo.

Tabla 30. Valores de índices globales de polifenoles en orujos antes y después del secado: antocianos totales (mg malvidina / g de orujo), taninos totales (mg catequina / g de orujo), polifenoles totales (mg ácido gálico equivalente / g de orujo) y actividad antioxidante (EC_{20}). Los resultados se presentan como el valor medio \pm su desviación estándar. Valores medios con letras diferentes (a, b, c, d y e) son estadísticamente distintos para un valor de confianza del 95% ($p < 0,05$).

PARÁMETRO	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH	VALORES MEDIOS
ORUJO HÚMEDO (SIN SECAR)						
ANTOCIANOS TOTALES	1,31 \pm 0,03 ^b	2,34 \pm 0,21 ^d	0,61 \pm 0,02 ^a	1,95 \pm 0,11 ^c	1,52 \pm 0,06 ^b	1,55 \pm 0,62
TANINOS TOTALES	16,02 \pm 0,28 ^c	14,66 \pm 0,56 ^{b,c}	15,95 \pm 0,67 ^c	12,68 \pm 1,20 ^{a,b}	11,02 \pm 1,05 ^a	14,06 \pm 2,14
POLIFENOLES TOTALES	16,38 \pm 0,40 ^b	14,57 \pm 0,99 ^a	14,29 \pm 0,08 ^a	14,53 \pm 0,69 ^a	13,73 \pm 0,02 ^a	14,70 \pm 1,03
ACTIVIDAD ANTIOXID.	1,91 \pm 0,07 ^a	2,33 \pm 0,06 ^b	1,95 \pm 0,07 ^a	2,36 \pm 0,11 ^b	2,58 \pm 0,03 ^c	2,22 \pm 0,28
ORUJO SECO						
ANTOCIANOS TOTALES	3,87 \pm 0,07 ^b	6,57 \pm 0,06 ^e	1,72 \pm 0,08 ^a	6,08 \pm 0,06 ^d	4,62 \pm 0,04 ^c	4,57 \pm 1,82
TANINOS TOTALES	24,53 \pm 0,64	20,91 \pm 2,00	24,16 \pm 3,15	21,19 \pm 2,20	22,61 \pm 1,27	22,68 \pm 2,18
POLIFENOLES TOTALES	49,70 \pm 0,90 ^c	43,85 \pm 0,06 ^a	44,73 \pm 1,08 ^a	46,57 \pm 0,62 ^b	44,11 \pm 0,25 ^a	45,79 \pm 2,35
ACTIVIDAD ANTIOXID.	0,67 \pm 0,01 ^a	0,95 \pm 0,02 ^c	0,76 \pm 0,02 ^b	0,93 \pm 0,04 ^c	1,07 \pm 0,01 ^d	0,88 \pm 0,15
% [PARÁMETRO] _{ORUJO SECO} / [PARÁMETRO] _{ORUJO HÚMEDO}						
ANTOCIANOS TOTALES	295%	281%	280%	312%	303%	295%
TANINOS TOTALES	153%	143%	152%	167%	205%	161%
POLIFENOLES TOTALES	303%	301%	313%	321%	321%	312%

El contenido en taninos totales también presenta una cierta heterogeneidad entre los distintos orujos estudiados, siendo el valor más bajo los 11,02 mg catequina / g de orujo de syrah y el más alto, los 16,02 mg catequina / g de orujo de tempranillo.

En consonancia con estos valores, son los orujos de syrah los que presentan un valor de EC_{20} mayor (2,58) y los de tempranillo un valor menor (1,91). Estos datos

ponen en evidencia una cierta heterogeneidad de los orujos estudiados, en base a la variedad de procedencia.

En la misma *Tabla 30* se muestran también los valores de estos parámetros analizados una vez secados los orujos, indicados como *ORUJO SECO*; estos valores son los correspondientes a los parámetros analizados, una vez realizada la corrección pertinente debida al proceso de secado, es decir, son los datos relativos al peso de orujo original de la variedad, corrigiendo el aumento debido al proceso de concentración por la pérdida de agua durante el secado de los mismo en la cámara climática.

Para una mejor evaluación de estos datos se han representado en la *Figura 39* los valores de los índices globales por procedencia varietal del orujo, y el valor medio de todos, y en la *Figura 40* los datos de actividad antioxidante.

En la *Figura 39* se ha representado la desviación estándar de los resultados y las diferencias significativas entre los orujos estudiados por su origen varietal, indicándose por diferentes letras (a-d) los valores medios que son significativamente distintos, para un valor de confianza de 95%, mediante el estudio LSD de Fischer. No se ha considerado hacer dicho estudio considerando las muestras húmedas y secas, ya que la diferencia de concentración entre ambos estudios para los parámetros considerados es evidente.

A simple vista se observa que los valores de los índices globales medidos en los orujos secos son significativamente superiores a los que presentan los orujos húmedos, de hecho los datos muestran un aumento en torno al 300% de los valores de estos parámetros con el secado, excepto en taninos totales que el aumento medio es en torno al 160%.

Al observar la gráfica de la actividad antioxidante también se puede ver que ésta es mayor para los extractos de orujos secos, del orden de 2,5 veces superior. Hay que tener en cuenta la forma en la que expresamos la actividad antioxidante al considerar esta gráfica; cuanto menor es el resultado EC_{20} mayor es la actividad antioxidante.

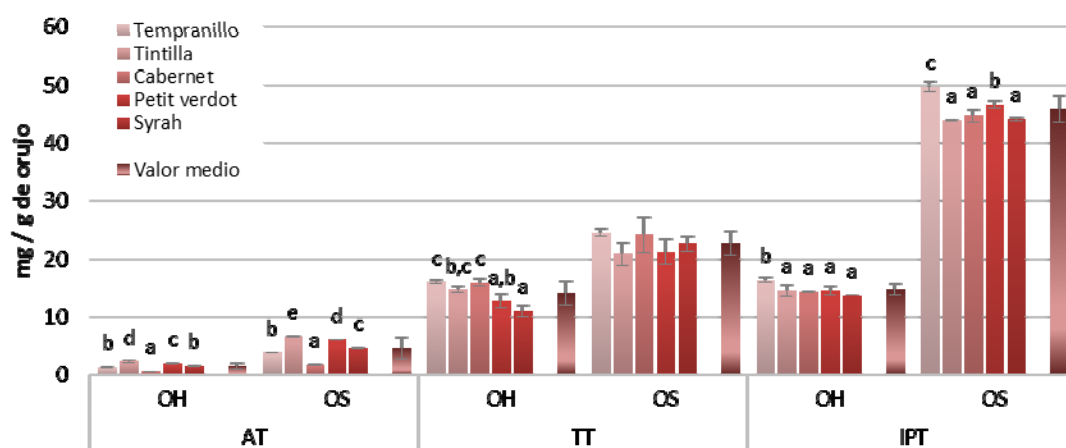


Figura 39. Representación gráfica de los contenidos en antocianos totales (AT), taninos totales (TT) y polifenoles totales (PT) obtenidos a partir de los orujos húmedos (OH) y secos (OS) de las vinificaciones de las variedades tintas tempranillo, tintilla de Rota, cabernet sauvignon, petit verdot y syrah.

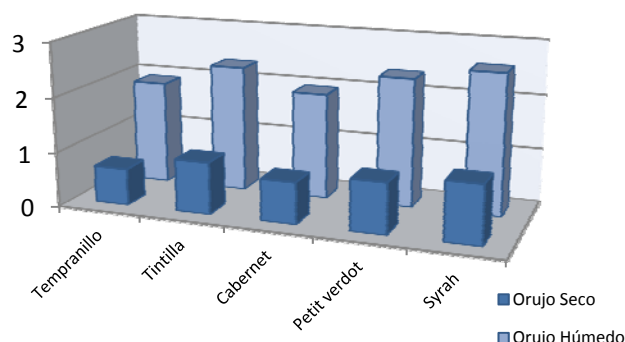


Figura 40. Representación gráfica de los valores medios de actividad antioxidante medida como EC_{20} , de los orujos húmedos y secos de las vinificaciones de las variedades tintas tempranillo, tintilla de Rota, cabernet sauvignon, petit verdot y syrah.

Estos datos coinciden con los resultados obtenidos por Márquez y colaboradores (2013)¹⁵ los cuales encuentran que en el proceso de secado de uva tempranillo, merlot y syrah para la elaboración de vinos tintos dulces se observa un aumento del índice de polifenoles totales durante el tiempo de secado en la cámara con un máximo a las 48 horas de secado, presentando la variedad tempranillo un aumento más acusado que la variedad syrah, al igual que en nuestro estudio.

Esta misma tendencia también fue encontrada por da Silva y colaboradores (2013)¹⁶ al estudiar los cambios en la actividad antioxidante de los residuos de la piña durante los procesos de secado, observando también un aumento en el contenido de polifenoles totales y flavonoides totales en el subproducto de piña secado con corriente de aire a 45 °C y 60°C; la misma tendencia también fue observada por Chang y colaboradores (2006)¹⁷ al estudiar el proceso de secado del tomate en horno a 80 °C y por liofilización, encontrando que las muestras secadas en horno presentaban

¹⁵ Marquez, A. *et al.*, *J. Agric. Food Chem.*, 2013, **61**, 9908–9914.

¹⁶ da Silva, D.I.S., *et al.*, *Ind. Crops Prod.*, 2013, **50**, 557–62.

¹⁷ Chang, C.H. *et al.*, *J. Food Eng.*, 2006, **77**, 478–485.

valores de polifenoles totales y flavonoides totales, referidas al peso del tomate fresco, superiores a las de tomate fresco, e incluso a las liofilizadas.

Márquez y colaboradores (2013)¹⁵ estudiando el proceso de secado de uvas tintas tempranillo, syrah y merlot, a una temperatura constante de 40 °C, observaron que los mostos procedentes de uvas secadas presentaban índices de pardeamiento (densidad óptica a 420 nm) superiores al mosto procedente de uvas no secadas, siendo este aumento superior en aquellas uvas secadas al sol. Ellos sugieren que la evaporación continua de agua durante el secado en cámara puede bloquear la entrada de oxígeno en la uva impidiendo la acción de las enzimas, este efecto no es tan acusado en las uvas secadas al sol, ya que durante la noche el proceso de evaporación se interrumpe por la bajada de temperatura ambiental.

Es evidente que el aumento del contenido en antocianos totales, taninos totales y polifenoles totales de los orujos secos frente a los húmedos, está en consonancia con lo observado por estos autores: el proceso de secado de los orujos supone un claro aumento de sustancias antioxidantes, más allá del que era previsible por el proceso de concentración durante el secado de las muestras.

Teniendo en cuenta que estas medidas son índices globales, se consideró adecuado el estudio pormenorizado de los compuestos fenólicos de mayor interés, concretamente de derivados benzoicos y cinámicos, flavanoles, flavonoles y antocianinas.

Mediante el análisis por UHPLC-PDA se han identificado 6 compuestos fenólicos de bajo peso molecular: 3 derivados del ácido benzoico, los ácidos protocatéquico, vainílico y síringico, y 3 derivados del ácido cinámico, los ácidos clorogénico, cafeico y ferúlico, también se han identificado dos flavanonas, catequina y epicatequina, y un fenol, el tirosol. Todos ellos, salvo el ácido ferúlico y el clorogénico, aparecen en las diez muestras estudiadas, y en todos los casos sus niveles de concentración son

superiores en los extractos de las muestras secadas que en los de las muestras no secadas, siendo este aumento significativo, en especial en los derivados benzoicos, cuyos niveles, en algunas variedades puede llegar a ser 10 veces más en las muestras de orujo secas. El contenido en flavanoles presenta una evolución similar por variedades, siendo el incremento observado en las muestras secas superior en las variedades syrah, petit verdot y cabernet sauvignon, que en las variedades tintilla de Rota y tempranillo, aunque en todos ellos los niveles son superiores a 2,5 veces en las muestras secadas que en las no secadas.

Tabla 31. Concentración de ácidos benzoicos y cinámicos, flavanoles y tirosol, en los extractos de orujos húmedos (OH) y secos (OS), expresada como mg / kg de orujo.

PARÁMETRO	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH	VALORES MEDIOS
Ac. Protocatéquico						
OH	119,11±3,68	170,45±5,71	155,01±0,74	57,69±3,47	115,44±0,37	123,54±41,21
OS	598,55±14,75	502,73±26,67	539,61±36,17	363,53±16,76	417,31±11,25	484,35±90,49
Ac. Vainílico						
OH	5,07±0,53	8,25±0,55	8,79±0,74	0,72±0,13	4,85±0,70	5,53±3,08
OS	40,06±1,54	53,31±2,15	42,45±0,45	28,90±1,61	45,31±2,24	42,01±8,46
Ac. Siringico						
OH	36,35±5,34	29,83±7,92	58,62±5,97	38,49±5,47	32,54±5,1	39,17±10,77
OS	174,6±1,39	148,58±1,73	202,53±1,12	199,53±0,52	188,35±1,01	182,72±21,24
Ac. Clorogénico						
OH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
OS	26,56±0,00	24,71±1,79	20,05±0,19	30,79±2,38	22,77±0,81	24,97±3,95
Ac. Cafeico						
OH	10,40±0,43	12,08±1,05	13,89±0,74	20,03±0,57	7,70±0,83	12,82±4,40
OS	15,60±2,49	13,28±0,76	24,92±0,03	57,82±0,72	16,08±0,53	25,54±17,54
Ac. Ferúlico						
OH	21,35±0,27	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
OS	n.d.	18,41±0,32	n.d.	17,06±0,21	17,64±0,01	-
Tirosol						
OH	80,03±26,05	42,66±3,05	71,61±6,16	57,94±2,98	35,20±2,58	55,03±17,72
OS	233,99±37,36	151,29±1,39	264,22±16,35	200,58±23,19	200,71±5,09	210,16±42,82
Catequina						
OH	194,44±15,35	123,85±37,08	316,04±45,65	212,80±13,81	86,14±0,10	186,66±86,25
OS	444,50±9,76	273,53±13,3	978,25±54,07	784,65±0,19	406,00±17,17	577,39±276,79
Epicatequina						
OH	87,28±5,38	43,88±5,68	82,71±13,73	86,68±14,13	63,64±4,38	72,84±19,18
OS	222,19±30,34	109,92±11,48	342,72±7,92	325,79±8,04	432,54±41,81	286,63±118,15

El estudio del contenido de antocianinas individuales de los residuos de orujo ha permitido identificar 10 compuestos, todos ellos esterificados, glucosilados, en el C₃, cinco de ellos están unidos a ácidos orgánicos por el C₆ (Tabla 32).

La tendencia observada hasta ahora del aumento de la concentración con el proceso de secado no queda tan evidente en este estudio, salvo para los derivados de malvidina, todos ellos presentan un claro aumento de concentración con el proceso de secado, en torno a unas 2,5 veces superior. Este aumento repercute en los valores globales de este parámetro, ya que los derivados de la malvidina se encuentran entre las antocianinas más abundantes detectadas en los orujos estudiados, en concreto malvidin-3-glucósido y malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (trans).

Tabla 32. Concentración de antocianinas individuales identificadas en los extractos de orujos varietales húmedos (OH) y secos (OS), expresada como mg / kg de orujo.

PARÁMETRO	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH	VALORES MEDIOS
Delfinidin-3-glucósido (3GD)						
OH	6,96±0,09	8,72±0,45	4,48±0,32	6,46±0,09	4,15±0,02	6,15±1,78
OS	6,78±0,17	5,44±0,78	3,89±0,06	6,85±0,02	3,29±0,17	5,25±1,56
Cianidin-3-glucósido (3GC)						
OH	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	-
OS	3,34±0,13	n.d.	2,92±0,00	n.d.	n.d.	1.25±1.62
Petunidin-3-glucósido (3GPt)						
OH	23,08±1,77	20,75±0,56	7,83±0,29	22,97±0,07	8,89±0,49	16,71±7,27
OS	24,17±1,1	16,9±0,08	6,55±0,12	28,95±1,28	7,44±0,31	16,80±9,38
Peonidin-3-glucósido (3GPd)						
OH	27,02±2,38	83,84±1,06	15,66±0,46	37,99±1,57	22,21±0,81	37,34±25,7
OS	31,64±0,70	146,47±4,59	16,50±0,25	72,67±1,68	26,88±0,5	58,83±50,41
Malvidin-3-glucósido (3GM)						
OH	252,36±4,38	859,95±57,48	152,21±0,99	498,64±6,27	209,66±20,02	394,56±275,86
OS	380,94±36,35	1597,24±23,63	177,97±4,46	927,59±73,08	311,49±16,69	679,05±554,51
Malvidin-3-(6-O-acetil)-glucósido (AGM)						
OH	82,43±0,86	149,37±3,99	133,22±2,44	424,64±4,04	223,17±21,44	202,57±126,54
OS	132,09±10,23	268,40±6,53	170,19±1,41	849,58±48,13	392,30±10,52	362,51±274,20
Malvidin-3-(6-O-cafeoil)-glucósido (CafGM)						
OH	77,70±3,05	69,58±0,65	17,68±0,38	78,38±6,11	63,94±5,62	61,46±23,93
OS	156,09±8,66	173,88±3,3	17,11±0,38	221,89±3,89	146,53±12,86	143,1±72,02
Petunidin-3-(6-O-p-cumaroil)glucósido (CGPt)						
OH	33,87±4,04	47,78±0,86	8,35±0,93	35,21±1,13	51,14±2,28	35,27±15,97
OS	50,19±1,78	125,1±8,83	6,4±0,47	86,86±3,75	169,74±15,98	87,66±60,23
Malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (cis) (CGM)						
OH	57,13±3,62	31,38±0,51	5,41±0,39	25,44±1,03	66,53±6,33	37,18±23,42
OS	119,31±4,49	90,62±12,33	11,77±0,33	118,29±7,19	232,6±19,48	114,52±75,15
Malvidin-3-(6-O-p-cumaroil)-glucósido (trans) (3tCGM)						
OH	387,22±13,03	776,87±4,21	48,50±4,5	458,39±28,94	911,55±44,64	516,51±321,28
OS	830,23±23,32	1905,40±81,82	69,60±1,29	968,84±17,49	2136,6±93,06	1182,14±795,7

9. Estudio de la viabilidad del proceso de deshidratación por secado en cámara...

Por variedad, son las variedades tintilla de Rota y petit verdot las que presentan mayores contenidos, y en el otro extremo se encuentra los orujos de cabernet sauvignon, al ser los orujos menos ricos en antocianinas y a los que menos les afecta el proceso de secado en su composición.

El estudio de los flavonoles individuales ha permitido identificar 5 glucósidos (*Tabla 33*), siendo el kaempferol-3-glucósido el mayoritario en todas las muestras estudiadas. El aumento más significativo se encuentra en el caso del kaempferol-3-glucósido, donde se observa un aumento para todas los orujos varietales, a excepción de los orujos de cabernet sauvignon; son estos orujos nuevamente los que presentan niveles más bajos de flavonoles, en torno a los 10 mg / kg de orujo; los orujos de tintilla de Rota y syrah son los que presentan valores de concentración superiores, aumentando esta con el proceso de secado.

Tabla 33. Concentración de flavonoles individuales identificadas en los extractos de orujos varietales húmedos (OH) y secos (OS), expresada como mg / kg de orujo.

PARÁMETRO	TEMPRANILLO	TINTILLA DE ROTA	CABERNET SAUVIGNON	PETIT VERDOT	SYRAH	VALORES MEDIOS
Miricetin-3-glucurónido						
OH	21,04±0,46	51,91±0,99	16,36±0,18	33,94±0,79	18,80±1,65	28,41±13,96
OS	26,22±0,38	87,69±4,69	14,45±0,11	54,79±0,66	22,27±0,61	41,08±28,50
Miricetin-3-glucósido						
OH	16,73±0,49	26,60±0,87	21,57±1,06	17,81±0,54	14,75±0,20	19,49±4,45
OS	26,94±0,30	47,77±1,77	37,12±0,79	34,84±0,94	24,30±0,16	34,19±8,77
Quercetin-3-glucurónido						
OH	12,63±0,04	11,82±0,07	8,85±0,02	13,61±0,01	11,13±0,43	11,61±1,70
OS	17,21±0,17	17,90±0,48	6,97±0,04	22,20±0,56	13,37±0,11	15,53±5,40
Quercetin-3-rutinósido						
OH	12,56±0,68	14,89±0,47	11,60±0,07	13,23±1,60	12,76±0,65	13,01±1,31
OS	15,31±0,28	17,90±0,69	13,76±0,05	20,26±0,16	16,29±0,46	16,70±2,37
Kaempferol-3-glucósido						
OH	36,37±0,47	61,76±2,87	11,66±0,25	44,16±0,63	63,36±8,44	43,46±20,18
OS	60,24±1,25	124,80±5,32	11,10±0,71	71,87±1,49	133,13±4,55	80,23±47,28

Si estudiamos el contenido medio de los orujos, de forma global, el contenido de compuestos fenólico, en cualquiera de las familias estudiadas, es superior en los orujos secos que en los orujos sin secar; este aumento es del orden de 3 veces mayor para los flavanoles, 1,6 veces mayor para flavonoles y 2 veces superior en antocianos como se observa en los gráficos mostrados en la *Figura 41*, en la que se han representado los niveles medios de cada uno de los compuestos identificados por familia, diferenciando entre orujos húmedos y secos.

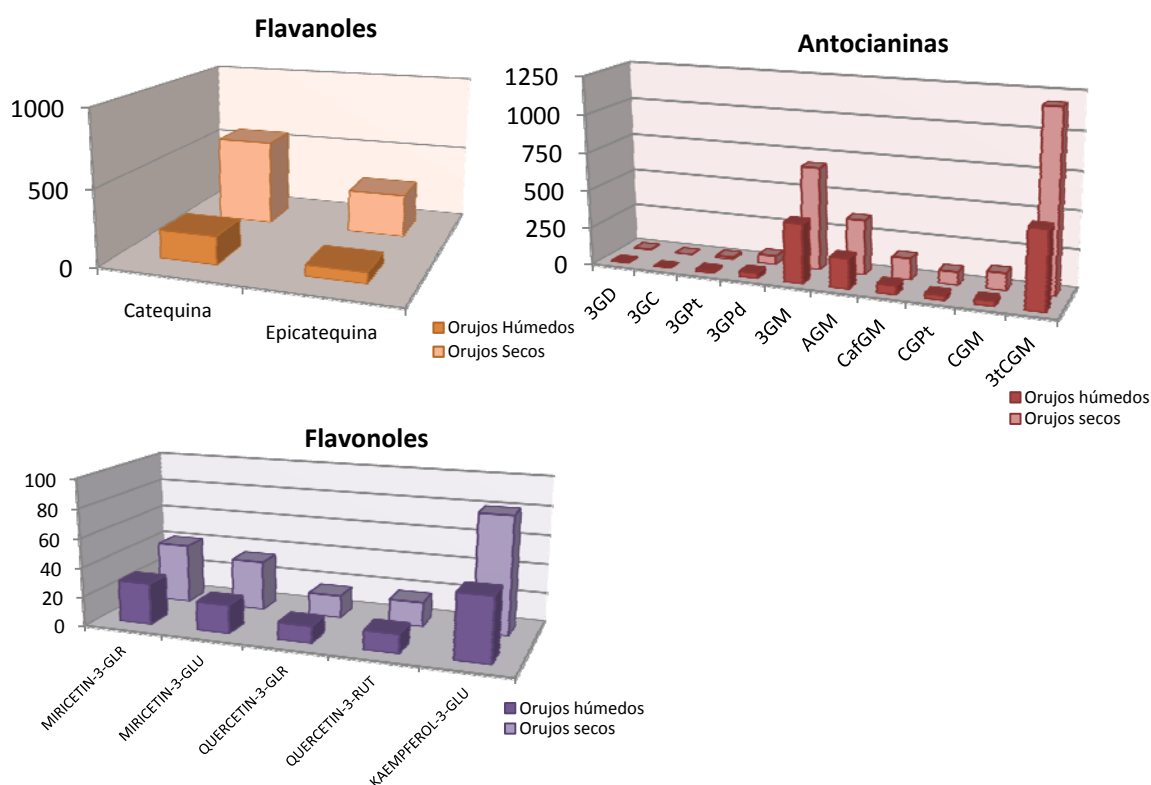


Figura 41. Representación gráfica del contenido en flavanoles, flavonoles y antocianinas, expresados como mg / Kg de orujo, para los extractos de muestras de orujos secas y húmedas.

9.2.3. Conclusiones.

- En base a los resultados obtenidos podemos concluir que el secado de los orujos de variedades tintas, por medio de la utilización de cámaras climáticas, a temperatura de 40 °C y 10% de humedad relativa, durante 24 horas, resulta ser un método de secado no solo adecuado y viable, sino incluso beneficioso y aconsejable. Por un lado, se consigue la deshidratación de la muestra, mejorando de esta forma su estado de conservación y durabilidad de una forma rápida y económica. Por otro, se aumenta la permeabilidad del tejido celular del hollejo, obteniéndose extractos mucho más ricos en polifenoles y actividad antioxidante.
- Se observa un comportamiento en base a la naturaleza varietal de los orujos, siendo los de cabernet sauvignon los que presentan niveles algo inferiores de los parámetros estudiados y los de tintilla de Rota y petit verdot los que presentan niveles superiores, esta tendencia es evidente en el contenido en flavanoles, flavonoles y antocianinas. Este comportamiento nos permitiría discriminar entre orujos varietales dependiendo de la actividad industrial a la que posteriormente vaya encaminado el mismo.

9.3. BIBLIOGRAFÍA.

- Chamorro, S., Goñi, I., Viveros, A., Hervert-Hernández, D., & Brenes, A. (2011). Changes in polyphenolic content and antioxidant activity after thermal treatments of grape seed extract and grape pomace. *European Food Research and Technology*, 234(1), 147–155.
- Chang, C. H., Lin, H. Y., Chang, C. Y., & Liu, Y. C. (2006). Comparisons on the antioxidant properties of fresh, freeze-dried and hot-air-dried tomatoes. *Journal of Food Engineering*, 77(3), 478–485.
- da Silva, D. I. S., Nogueira, G. D. R., Duzzioni, A. G., Barrozo, M. A. S. (2013). Changes of antioxidant constituents in pineapple (*Ananas comosus*) residue during drying process. *Industrial Crops and Products*, 50, 557-562.
- Hartley, R. D., Morrison III, W. H., Himmelsbach, D. S., & Borneman, W. S. (1990). Cross-linking of cell wall phenolic arabinoxylans in graminaceous plants. *Phytochemistry*, 29(12), 3705–3709.
- Khanal, R. C., Howard, L. R., & Prior, R. L. (2010). Effect of heating on the stability of grape and blueberry pomace procyanidins and total anthocyanins. *Food Research International*, 43(5), 1464–1469.
- Kim, S. Y., Jeong, S. M., Park, W. P., Nam, K. C., Ahn, D. U., & Lee, S. C. (2006). Effect of heating conditions of grape seeds on the antioxidant activity of grape seed extracts. *Food Chemistry*, 97(3), 472–479.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45(4), 1390–1393.
- Marquez, A., Dueñas, M., Serratos, M. P., & Merida, J. (2012). Formation of vitisins and anthocyanin-flavanol adducts during red grape drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 6866–6874.
- Marquez, A., Serratos, M. P., & Merida, J. (2013). Anthocyanin evolution and color changes in red grapes during their chamber drying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(41), 9908–9914.
- Rajha, H., Ziegler, W., Louka, N., Hobaika, Z., Vorobiev, E., Boechzelt, H., & Maroun, R. (2014). Effect of the Drying Process on the Intensification of Phenolic Compounds Recovery from Grape Pomace Using Accelerated Solvent Extraction. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(10), 18640–18658.
- Ratti, C. (2001). Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review. *Journal of Food Engineering*, 49(4), 311–319.

9. Estudio de la viabilidad del proceso de deshidratación por secado en cámara...

- Ruíz Bejarano, M. J., Rodríguez Dodero, M. C., & Barroso, C. G. (2010). Optimizing the process of making sweet wines to minimize the content of ochratoxin A. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(24), 13006–13012.
- Sólyom, K., Solá, R., Cocero, M. J., & Mato, R. B. (2014). Thermal degradation of grape marc polyphenols. *Food Chemistry*, 159, 361–366.
- Tseng, A., & Zhao, Y. (2012). Effect of Different Drying Methods and Storage Time on the Retention of Bioactive Compounds and Antibacterial Activity of Wine Grape Pomace (Pinot Noir and Merlot). *Journal of Food Science*, 77(9), H192–H201.
- Vashisth, T., Singh, R. K., & Pegg, R. B. (2011). Effects of drying on the phenolics content and antioxidant activity of muscadine pomace. *LWT - Food Science and Technology*, 44(7), 1649–1657.

CAPÍTULO 10. APLICABILIDAD COSMÉTICA.

10.1. FUNDAMENTOS DE COSMÉTICA.

La historia de la cosmética es paralela a la de la propia humanidad. Hay rastros de cuidados cosméticos utilizados por el hombre durante el Paleolítico, cuando se untaban con grasas animales para proteger el cuerpo, y con arcillas y jugos de plantas y semillas para adornarlo. Sumerios y babilonios, preparaban ungüentos y esencias aromáticas¹. En el antiguo Egipto se desarrollaron y usaron ampliamente las cremas cosméticas, productos para el cabello y afeitado, maquillajes y perfumes, siendo también ampliamente utilizados en Grecia y durante el imperio Romano. Los ingredientes cosméticos eran de origen vegetal, animal o mineral. Muchos de los ingredientes cosméticos utilizados por entonces se siguen manteniendo en los preparados actuales. A lo largo de la historia, la cosmética aparece como un rasgo de civilización, de manera que aquellos momentos de la historia de mayor apogeo social y cultural, coinciden con los de mayor desarrollo y uso de productos cosméticos. Por ejemplo, durante la edad media, un periodo más oscurantista y decadente, la belleza se considera pecaminosa, llegándose a perder incluso los hábitos de aseo, mientras que con el renacimiento volvió el desarrollo cultural y el de la cosmética. A lo largo de la edad moderna, empiezan a aparecer las primeras empresas de productos de tocador, se refina mucho más su elaboración y van apareciendo modas y tendencias en cuanto al uso de maquillajes y perfumes. En la actualidad, los cosméticos son ampliamente utilizados y demandados por la sociedad, de forma que la industria cosmética se ha convertido en una de las más importantes e influyentes.

A día de hoy, la fabricación de los productos cosméticos está ampliamente controlada y regulada. Existen en nuestro país normativas europeas y estatales que regulan la fabricación y comercialización de los productos cosméticos. En España, es la Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios, dependiente del Ministerio

¹ Ferraro, G. E. et al. *Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales*, 1ª ed., 2012.

de Sanidad, la encargada de este menester. En cuanto a la normativa vigente en esta materia, encontramos en nuestro ordenamiento jurídico el Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos², que recopiló la directiva europea 76/768/CEE, del Consejo, de 27 de julio de 1976, y que ha sido modificado en varias ocasiones (R.D. 2131/2004, R.D. 209/2005, R.D. 944/2010) para incorporar las nuevas modificaciones y directivas europeas. La directiva europea del 76 ha sido modificada en tantas ocasiones y de forma tan sustancial que, para mayor claridad, se ha refundido todo en el Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos³, de ordenado cumplimiento para todos los estados miembros a partir del 11 de julio de 2013.

Ante de seguir adentrándonos en el mundo de la cosmética, resulta apropiado, llegados a este punto, dejar claro el concepto de cosmético. En el Reglamento (CE) 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo se define un producto cosmético como: “toda sustancia o mezcla destinada a ser puesta en contacto con las partes superficiales del cuerpo humano (epidermis, sistema piloso y capilar, uñas, labios y órganos genitales externos) o con los dientes y las mucosas bucales, con el fin exclusivo o principal de limpiarlos, perfumarlos, modificar su aspecto, protegerlos, mantenerlos en buen estado o corregir los olores corporales.”

Hay entonces que destacar la diferencia entre un cosmético y un medicamento o fármaco. Según la legislación vigente, quedan excluidos de la definición de cosméticos: *“aquellos preparados destinados a la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades, así como los destinados a ser ingeridos, inhalados, inyectados o implantados en el cuerpo humano. Tampoco se consideran cosméticos aquellos preparados destinados a la protección frente a la contaminación o infección por microorganismos, hongos o parásitos”*. Por tanto, la principal diferencia entre un

² BOE-A-1997-23067

³ DOUE-L-2009-82517

cosmético y un medicamento radica en que los cosméticos no tienen efectos terapéuticos. No pueden prevenir ni curar enfermedades. Se aplican sobre la piel sana para mantenerla en buen estado y embellecerla. Los cosméticos han de ser completamente inocuos y no se admite el concepto de efecto secundario o el balance beneficio / riesgo como en los medicamentos. Los requerimientos administrativos para la comercialización de un cosmético son mucho menos exigentes que los necesarios para la comercialización de un producto farmacéutico.

Podemos encontrar multitud de productos cosméticos en el mercado. El Anexo 1, del R.D. 1599/1997, de 17 de octubre, recoge una lista, por categorías, de los distintos tipos de cosméticos que existen.

La formulación de un cosmético normalmente viene dada por cuatro tipos distintos de ingredientes⁴:

- **Los principios activos:** son los ingredientes responsables de realizar la función a la que está destinado el cosmético.
- **Los excipientes o vehículos cosméticos:** son el conjunto de ingredientes de un cosmético en los que se incorporan los demás compuestos. Los excipientes transportan los principios activos a través de la piel y de ellos depende la absorción del cosmético por la piel, la estabilidad de los principios activos, su liberación y la forma cosmética.
- **Los correctores:** son sustancias que se adicionan para mejorar las características del cosmético en cuanto a sus propiedades y aplicación, mejorando de esa forma su calidad.
- **Los aditivos:** se utilizan para mejorar las características organolépticas y conservación del cosmético. Entre ellos encontramos colorantes, conservantes y perfumes.

⁴ Sabater, I. and Mourelle, L. *Cosmetología para estética y belleza*, 1ª ed., 2013.

Aunque se encuentran en el mercado formas cosméticas anhidridas, como los aceites de masaje o los polvos de maquillaje, y acuosas, como algunas lociones y tónicos faciales, lo más habitual en cuanto a cosméticos se refiere, es encontrar sistemas heterogéneos como geles, suspensiones y emulsiones. Las emulsiones son las formas más comunes. Las emulsiones se definen como sistemas estables bi- o polifásicos, donde una fase líquida se dispersa en otra fase líquida no miscible con ella. La estabilidad de las emulsiones viene dada por una serie de compuestos denominados emulsionantes, moléculas de naturaleza anfipática capaces de disminuir la tensión superficial entre las fases estabilizando el sistema. Teniendo en cuenta que fase es la que se dispersa, se pueden clasificar las emulsiones en:

- Emulsiones O/W (aceite en agua): la fase dispersa o interna, también llamada discontinua es oleica y la externa o dispersante es acuosa.
- Emulsiones W/O (agua en aceite): la fase interna o dispersa es acuosa y la externa o dispersante, oleica.

Las emulsiones son tan utilizadas porque permiten incorporar al cosmético compuestos de distinta naturaleza, tanto hidrofílicos como lipofílicos, además de presentar una gran afinidad por la piel y una gran capacidad de penetración.

En cuanto a la penetración de los cosméticos en la piel, hay que tener en cuenta que la piel es una barrera difícil de atravesar. Estructuralmente, la piel puede dividirse en tres capas bien diferenciadas, que desde la superficie hacia el interior se denominan: epidermis, dermis e hipodermis, siendo el estrato corneo la capa más externa de la epidermis. La piel tiene múltiples funciones como la de proteger el organismo frente a sustancias nocivas o radiaciones, regula la pérdida de calor, de fluidos, tiene una acción de protección mecánica, etc., es decir, tiene una función de barrera. Es la epidermis quien presenta la barrera a la permeabilidad, de forma que es tan impermeable como la piel completa y la dermis es completamente permeable.

Son las células corneas trabadas y entrelazadas del estrato corneo las que constituyen la barrera⁵.

Aunque muchas sustancias cosméticas pueden atravesar la piel, la mayoría lo hace de forma muy superficial, penetrando sólo en las capas más externas. En cualquier caso, hay que tener en consideración que la funcionalidad del cosmético normalmente va dirigida a estas capas externas y que la absorción del cosmético nunca ha de ser tan elevada como para llegar al torrente sanguíneo.

Para concluir este apartado, sólo nos queda por comentar como se puede evaluar la eficacia de los cosméticos en la piel. La eficacia de un cosmético se define como el grado de adecuación entre las propiedades reales del producto y las necesidades para las que ha sido creado. Aunque la eficacia es relativamente difícil de medir, los avances tecnológicos han permitido el desarrollo de una serie de métodos que consiguen realizar medidas cuantificables, aportando una información valiosa y fidedigna sobre la eficacia del cosmético. Así, por ejemplo, los corneómetros nos permiten evaluar el grado de hidratación de la piel; la colorimetría, los índices de melanina y hemoglobina; la Velocimetría Láser Doppler y las termografías, la microcirculación cutánea; o las perfilometrías, el relieve cutáneo, entre otras.

⁵ Wilkinson, J. B. and Moore, R. J. *Cosmetología de Harry*, 6ª ed., 2008.

10.2. UTILIZACIÓN DE LA UVA, EL VINO Y SUS DERIVADOS EN COSMÉTICA.

Existen multitud de textos antiguos en los que el vino aparece como un ingrediente de ungüentos y mezclas cosméticas. En las babilonias tablas de Nippur (sobre el año 2200 a. C.), considerada la primera farmacopea, o en los egipcios papiros de Ebers (1500 a. C.) se encuentran referencias sobre ungüentos hechos con vino para su uso contra ciertas alteraciones cutáneas⁶. De la medicina y farmacopea griega, romana y árabe proceden un gran número de recetas en las que el vino es parte importante. De igual modo, el vino aparece en la edad media en numerosas fórmulas magistrales de botica o farmacia y en no menor número de cremas y ungüentos de belleza⁷. Su utilización farmacopea en la antigüedad ha estado relacionada con su capacidad desinfectante, mientras que en cosmética se le ha dado diversa funcionalidad. Por ejemplo, en el antiguo Egipto y durante el imperio romano se utilizaba el vino para la elaboración de algunos perfumes. Los posos del vino se usaban a modo de pintalabios y coloretes económicos, y el vino también se utilizaba para la elaboración del khiphi, una especie de incienso utilizado en ritos funerarios. En el renacimiento, mujeres de la nobleza se lavaban la cara con vino, y se pueden encontrar en manuales de medicina popular recetas con vino para eliminar manchas y fortalecer el cutis.

Las tendencias cosméticas actuales, se han encaminado durante la última década hacia un interés por los productos naturales, forzando a la industria y a la comunidad científica a buscar componentes naturales alternativos⁸. Así aparecen

⁶ Fehér, J. et al., *Cent. Eur. J. Med.*, 2007, **2**, 379-391.

⁷ Martín, J. L. and Nogueras, A. *Actas del I simposio de la Asociación Internacional de Historia y Civilización de la Vid y el Vino*. 2001.

⁸ Glampedaki, P. and Dutschk, V., *Colloids Surf. A Physicochem. Eng. Asp.*, 2014, **460**, 306-311.

nuevos conceptos como el de cosmética natural o el de fitocosmética, que si bien no están reconocidos por la legislación vigente son ampliamente conocidos por el público en general. La cosmética natural hace referencia, básicamente, a aquella cosmética en la que no se utilizan productos de síntesis ni derivados del petróleo, mientras que la fitocosmética es aquella en la que sólo se utilizan productos de origen vegetal. Dentro de esta tendencia hacia lo natural, aparece también la cosmética alimentaria en la que frutas, cereales, miel o leche, entre otros, se utilizan para hidratar, nutrir y revitalizar la piel. Entre los alimentos que vuelven a estar en auge en el mundo de la cosmética, y decimos vuelven porque se han utilizado desde la antigüedad, están, por supuesto, el vino y la uva.

La utilización de la uva y el vino así como el uso de algunos de sus derivados como fitoingredientes, ha ido creciendo vertiginosamente a lo largo de los últimos años. Se pueden encontrar diversas marcas cosméticas, nacionales y extranjeras, basadas en la utilización de la uva, vino o derivados. Según la FDA (Food and Drug Administration) estadounidense, en 2012 existían 495 formulaciones cosméticas en las que se usaban extractos de pepita de uva, 238 con extractos de uva, 80 con extractos de hojas de *Vid* y apenas 15 formulaciones en las que se utilizaban como ingredientes otros derivados de la *Vitis vinífera* (zumo de uva, extractos de vid, etc). Estos ingredientes de *Vitis vinífera* son utilizados en una concentración relativamente baja en las formulaciones, siendo de aproximadamente del 2 - 3% sin llegar en muchos casos a superar el 1% de la formulación⁹. Sin embargo, es importante destacar que, aunque se indican formulaciones con extractos del fruto, la uva, o de la pepita y hojas de la vid, no aparecen formulaciones hechas con extractos de orujos, ni con ningún otro subproducto vitivinícola distinto a los mencionados.

La principal función cosmética asociada a la uva, vino o derivados está relacionada con la actividad antioxidante que les otorga su contenido polifenólico.

⁹ Fiume, M. M. et al., *Int. J. Toxicol.*, 2014, **33**, 48S-83S.

También se les ha atribuido propiedades fotoprotectoras y despigmentantes. Se pueden encontrar en el mercado productos cosméticos con ingredientes derivados de la uva o el vino tales como: lociones antiarrugas, antimanchas, hidratantes, exfoliantes o incluso de protección solar.

Podemos concluir destacando como, el cada vez mayor conocimiento científico sobre las propiedades saludables del vino y desarrollo tecnológico, unido a la búsqueda de ingredientes cosméticos naturales demandados por la sociedad, han dado lugar a una línea cosmética que se basa en la utilización de la uva, vino o derivados. De aquí aparece el término enocosmética, la cosmética que utiliza los beneficios del vino y sus derivados, o el término vinoterapia, más relacionados con los tratamientos de Spas o balnearios basados en el vino.

10.3. POTENCIALIDAD COSMÉTICA DE LOS SUBPRODUCTOS EN BASE A LOS ANALITOS ESTUDIADOS.

Se pueden encontrar diversos textos científicos en los que se habla sobre subproductos de vinificación y se hace mención de su posible aplicabilidad en la industria alimentaria, farmacológica o cosmética. En este apartado se ha hecho un estudio, en base a los parámetros analizados y los resultados obtenidos, de su posible utilidad en el campo de la cosmética. Para ello se ha realizado una investigación bibliográfica en la que se han buscado y recopilado las distintas propiedades cosméticas que se les ha podido atribuir a los analitos hallados en este estudio, valorándose a partir de ahí la aplicabilidad cosmética de los subproductos estudiados.

- **Polifenoles.**

Los compuesto polifenólicos se relacionan con una importante bioactividad. Entre las propiedades cosméticas que se les atribuyen podemos encontrar:

- ✓ **Actividad antioxidante y antiradicalaria.**

Como ya habíamos mencionado con anterioridad, los compuestos polifenólicos, por su estructura, presentan la capacidad de atrapar radicales libres. Los radicales libres son inherentes al propio catabolismo y anabolismo de los tejidos, incluido la piel¹⁰. Estos radicales son especies altamente reactivas, que pueden reaccionar con macromoléculas alterándolas y modificando su funcionalidad. Sin embargo, todos los organismos poseen un sistema defensivo contra la acción de los radicales libres, manteniendo un equilibrio entre los radicales formados y atrapados. Este sistema defensivo incluye enzimas como

¹⁰ Darr, D. and Fridovich, I., *J. Invest. Dermatol.*, 1994, **102**, 671-675.

la catalasa, glutatión reductasa, glutatión peroxidasas y superóxido dismutasa, y otras sustancias no enzimáticas como el glutatión, la vitamina C y vitamina E¹¹. Sin embargo, ciertos hábitos como la exposición a la radiación ultravioleta, la polución, el tabaquismo, una alimentación pobre o inadecuada, etc., puede aumentar la producción de radicales libres¹², dando lugar a un desequilibrio, de manera que se genera un estrés oxidativo que puede dañar macromoléculas como lípidos, proteínas e incluso ADN. En la piel, el estrés oxidativo da lugar, entre otros, al envejecimiento cutáneo. Nuestro endógeno sistema antioxidante puede ser reforzado aumentando el contenido en antioxidante bien a través de la dieta, o en el caso de la piel, también directamente a partir de aplicaciones tópicas¹³. Los compuestos polifenólicos actúan como antioxidante atrapando radicales libres, pero también pueden actuar inhibiendo ciertas enzimas relacionadas con la oxidación o de forma indirecta mediante la quelatación de ciertos iones de metales de transición que pueden actuar como catalizadores en los procesos de oxidación. Por tanto, la aplicación tópica de compuestos antioxidantes como los polifenoles, pueden proteger la piel del estrés oxidativo y del envejecimiento. Hay estudios que destacan, entre las distintas familias de polifenoles, a los antocianos como los compuestos que más contribuyen a la actividad antioxidante^{14,15}.

✓ Inhibidor enzimático.

Se ha demostrado en multitud de estudios *in vitro* que ciertos compuestos polifenólicos, como los flavonoides, pueden inhibir la actividad de varias

¹¹ Pinnell, S. R., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2003, **48**, 1-19.

¹² Goutzourelas, N. *et al.*, *Hum. Exp. Toxicol.*, 2014, **33**, 1099-1112.

¹³ Zillich, O. V. *et al.*, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2015, **37**, 455-464.

¹⁴ Jakobek, L. *et al.*, *Int. J. Food Sci. Technol.*, 2009, **44**, 860-868.

¹⁵ Teixeira, A. *et al.*, *Int. J. Mol. Sci.*, 2014, **15**, 15638-15678.

enzimas como la elastasa, hialuronidasa, 5-lipooxigenasa, ciclooxigenasa, etc¹⁶. Los compuestos polifenólicos pueden actuar inhibiendo la acción de algunas enzimas proteasas como la elastasa y colagenasa, que catalizan la degradación de las fibras de colágeno y elastina, encargadas de la firmeza y elasticidad de la piel^{17,18,19}.

✓ **Acción venotrópica.**

Los flavonoides son capaces de disminuir la permeabilidad de los capilares sanguíneos y de aumentar su resistencia. Aumentar la resistencia de los capilares, disminuyendo así su ruptura, es una propiedad muy buscada en cosmética ya que permite disminuir el enrojecimiento producido por los capilares de superficie²⁰.

✓ **Actividad anti-inflamatoria.**

Los compuestos polifenólicos, en particular los flavonoides, se han relacionado con cierta actividad anti-inflamatoria. La interacción con el ciclo del ácido araquidónico y la inhibición de ciertos mediadores pro-inflamatorios como las prostaglandinas parecen ser los responsables de dicha actividad²¹.

¹⁶ Hollman, P. C. H. *et al.*, *Food Chem.*, 1996, **57**, 43-46.

¹⁷ Lee, K. *et al.*, *Int. J. Cosmet. Sci.*, 2001, **23**, 341-346.

¹⁸ Piwowarski, J. P. *et al.*, *J. Ethnopharmacol.*, 2011, **137**, 937-941.

¹⁹ Thring, T. S. A. *et al.*, *BMC Complement. Altern. Med.*, 2009, **9**, 27.

²⁰ Ferraro, G. E. *et al.* *Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales*, 1ª ed., 2012.

²¹ Salvador, A. *et al.* *Analysis of cosmetic products*, 1ª ed., 2007.

✓ Fotoprotector.

La exposición a los rayos ultravioleta del sol puede producir efectos adversos en la piel como eritemas, quemaduras, hiperpigmentación, envejecimiento prematuro o cáncer. Se ha comprobado el efecto fotoprotector de distintos polifenoles utilizados tópicamente, tanto en animales como en personas, concluyéndose que compuestos como el ácido cafeico²², ferúlico^{22,23}, clorogénico²⁴, y el compuesto epigallocatequin-3-galato²⁵, entre otros, presentan un efecto fotoprotector frente a los rayos solares.

✓ Actividad anti-microbial.

Se ha demostrado que muchos extractos polifenólicos de plantas, incluidos los extractos procedentes de pepitas de uva, tienen actividad anti-microbial frente a distintos tipos específicos de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas²⁶. Se ha determinado actividad sobre bacterias como *Bacillus cereus*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*²⁷. También han mostrado actividad antifúngica frente a *Botrytis cinerea*²⁸.

²² Saija, A. et al., *Int. J. Pharm.*, 2000, **199**, 39-47.

²³ Baumann, L. S., *Dermatol. Ther.*, 2007, **20**, 330-342.

²⁴ Kitagawa, S. et al., *Chem. Pharm. Bull.*, 2011, **59**, 793-796.

²⁵ Sevin, A. et al., *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.*, 2007, **21**, 650-656.

²⁶ Delgado Adámez, J. et al., *Food Control*, 2012, **24**, 136-141.

²⁷ Jayaprakasha, G. K. et al., *Food Res. Int.*, 2003, **36**, 117-122.

²⁸ Mendoza, L. et al., *Ind. Crops Prod.*, 2013, **43**, 360-364.

Queda por tanto patente la importante y diversa actividad cosmética que se les ha asociado a los compuestos polifenólicos, que va mucho más allá de su conocida actividad antioxidante. Como se ha puesto de manifiesto en este estudio, los subproductos estudiados, tanto uvas de aclareo como orujos, poseen importantes cantidades de compuestos polifenólicos, con valores medios de 11,22 mg GAE/ g uva de aclareo y 16,2 mg GAE/ g orujo (GAE: equivalentes de ácido gálico). Las principales actividades cosméticas se han relacionado con los compuestos flavonoides. En los subproductos estudiados, el 86% de los compuestos polifenólicos determinados para la uva de aclareo y 85% para los orujos son flavonoides, si bien la composición en flavonoides es distinta para cada subproducto. Como se ha mencionado, los antocianos constituyen unas de las familias polifenólicas a las que mayor actividad antioxidante se le ha atribuido. Hay que destacar entonces el contenido en antocianos hallado en los orujos, que supone el 60,9% del contenido total que se determinó en polifenoles. En el caso de la uva de aclareo, si bien el contenido es mucho menor, el 13,7% de media, no resulta una cantidad despreciable. Se ha mencionado el efecto fotoprotector asociado a ciertos ácidos fenólicos como el ácido cafeico, clorogénico o ferúlico. En este punto destaca la uva de aclareo en la que se determinaron todos estos ácidos cinámicos, con una cantidad media en estos compuestos de 48,8 mg / Kg de uva de aclareo. En el caso de los orujos sólo pudo determinarse ácido clorogénico, con un contenido medio de 24,87 mg / Kg de orujo.

Por tanto, ambos subproductos estudiados presentan un contenido polifenólico muy adecuado, tanto en cantidad como en composición, para poder ser utilizados por la industria cosmética ya sea como principio activo o como aditivos. Resultaría muy ventajosa la utilización de orujos de las variedades petit verdot, tintilla de Rota o syrah, o uvas de aclareo con una maduración tecnológica próxima a 0,5, para ser utilizadas con fines cosméticos por su contenido polifenólico. Se desaconsejaría la utilización de la variedad cabernet sauvignon.

- **Ácidos orgánicos.**

Entre los ácidos orgánicos determinados, destacan por su actividad cosmética los conocidos como alfa-hidroxiácidos (AHA). Son ácidos con un grupo hidroxilo en posición alfa al grupo carboxilo. De los ácidos estudiados son AHA el ácido tartárico, málico, cítrico y láctico. Los AHA se han utilizado durante muchos años por su acción exfoliante, hidratante y emoliente^{29,30}. Actualmente su uso se ha expandido ampliamente, utilizándose para mejorar los efectos del envejecimiento, reduciendo arrugas y líneas de expresión mediante la renovación celular³¹. Estos compuestos actúan como quimioexfoliantes, disminuyen la adhesión de las células córneas, produciendo descamación. Destruyen porciones del tejido dérmico o epidérmico provocando así la regeneración de nuevo tejido dérmico o epidérmico. Estudios in vitro han demostrado un aumento de queratinocitos y fibras de colágeno al aplicar ácido glicólico o ácido láctico. Algunos AHA muestran también actividad antioxidante como el ácido cítrico, málico y tartárico³². El rango de concentración de AHA recomendado en productos cosméticos de uso diario es del 1 – 10%³³, ya que pueden producir irritación.

Todas las muestras de subproductos estudiadas en este trabajo han mostrado tener importantes cantidades en AHA, teniendo que destacar en esta cuestión a la uva de aclareo. En la uva de aclareo se encontró un contenido medio en ácidos orgánicos totales de 16,9 mg / g de uva de aclareo, de los cuales el 100% son AHA (ácido cítrico, tartárico y málico). Todos los AHA contenidos en la uva de aclareo son los que se han

²⁹ Ditre, C. M. *et al.*, *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1996, **34**, 187-195.

³⁰ Smith, W. P., *J. Am. Acad. Dermatol.*, 1996, **35**, 388-391.

³¹ Dutra, E. A. *et al.*, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2006, **40**, 242-248.

³² Van Scott, E. J. *et al.*, *Clin. Dermatol.*, 1996, **14**, 217-226.

³³ Okuda, M. *et al.*, *Toxicology in Vitro*, 2011, **25**, 2041-2047.

relacionado con cierta actividad antioxidante. En el caso de los orujos estudiados, aun cuando el contenido es inferior al de la uva de aclaro, los 8,5 mg de ácidos / g de orujo encontrados resultan ser una cantidad considerable. De esta cantidad el 83% corresponde a AHA. En los orujos, además de los AHA presentes en la uva de aclareo, puede encontrarse ácido láctico en un contenido medio del 3% del total hallado. Por consiguiente, ambos subproductos, especialmente las uvas de aclareo, podrían ser utilizados por la industria cosmética en cuanto a su contenido en AHA. En base a los resultados, no podríamos destacar la utilización de ninguna variedad de uva de aclareo u orujo, en particular, en cuanto a su contenido en AHA.

- **Aminoácidos .**

En relación a su actividad cosmética, los aminoácidos se relacionan con la hidratación y regeneración de la piel. El colágeno es el principal componente fibroso de la piel y le proporciona firmeza y resistencia. Está compuesto principalmente por glicina y prolina y sus derivados hidroxilados, lo cuales se hidroxilan una vez formadas las uniones peptídicas. Uno de los factores limitantes para la formación de colágeno es la biodisponibilidad de sus precursores. La síntesis de colágeno requiere de energía, aminoácidos, minerales, vitaminas y oxígeno. La aplicación tópica de aminoácidos puede influir en la síntesis de colágeno y otras proteínas cutáneas. Diversos estudios han revelado que la suplementación de arginina puede aumentar la deposición de colágeno³⁴.

Por otro lado, el estrato corneo contiene distintos compuestos conocidos en su conjunto como el factor de hidratación natural. Este factor está formado por aminoácidos libres o derivados, junto a ácido láctico, urea, citratos y azúcares.

³⁴ Barbul, A., *J. Nutr.*, 2008, **138**, 2021S-2024S.

Dicho factor higroscópico actúa reteniendo el agua, actuando como un humectante natural³⁵. Se ha relacionado las alteraciones de los niveles de aminoácidos libres en el estrato corneo con pieles secas. Por consiguiente, la aplicación tópica de aminoácidos en cosméticos tiene una acción hidratante además de regeneradora.

En los subproductos estudiados pudo determinarse un total de hasta diez aminoácidos libres. Destacaron los contenidos en los orujos frente a los de las uvas de aclareo con cantidades medias totales de 725 mg / kg de orujo y de 520 mg / kg de uva de aclaro. Resulta muy interesante destacar que el 85% de los aminoácidos libres hallados en los orujos son prolina, uno de los principales constituyentes del colágeno. Por su parte, el 68% de los aminoácidos encontrados en la uva de aclareo corresponde a arginina; se ha mencionado la existencia de estudios que muestran su relación con la síntesis de nuevo colágeno. En base a lo expuesto, el contenido en aminoácidos libres encontrado en los subproductos estudiados resultaría muy adecuado, por su composición, para ser utilizado por la industria cosmética. No podríamos destacar ninguna variedad de uva de las estudiadas como más aconsejable en cuanto a este parámetro, a excepción de la cabernet sauvignon para los orujos.

- **Vitamina E.**

Las vitaminas intervienen en procesos de regulación metabólica ya sea directamente o a través de sistemas enzimáticos. En cosmética, son las vitaminas liposolubles, la vitamina A, D, E y K las más importantes. Test clínicos han demostrado que las vitaminas pueden actuar en procesos protectores, correctores y de renovación de nuestra piel, siendo usualmente utilizadas para prevenir alteraciones relacionadas con el envejecimiento cutáneo³⁶.

³⁵ Rawlings, A. V. and Harding, C. R., *Dermatologic Therapy*, 2004, **17**, 43-48.

³⁶ Ferraro, G. E. et al. *Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales*, 1ª ed., 2012.

La vitamina E protege las membranas plasmáticas de la oxidación, inhibiendo la peroxidación de los ácidos grasos insaturados y la oxidación de otros compuestos de las membranas plasmáticas. En la industria cosmética la vitamina E puede utilizarse como principio activo pero también es muy utilizada como aditivo para proteger la integridad del productos cosmético³⁷.

Los aceites de los subproductos estudiados en este trabajo, especialmente los de orujos, han demostrado tener importantes cantidades de vitamina E. En los aceites de pepitas de uvas se encontraron de media 21,6 mg de tocoferoles / 100 g de aceite. En los orujos el valor medio fue de 95,7 mg tocoferoles / 100 g de aceite. En consecuencia, ambos tipos de aceites podrían ser utilizados por la industria cosmética en relación a su contenido en vitamina E, si bien resultan mucho más interesantes los de orujos en esta cuestión. Se aconsejaría la utilización de aceites de orujos procedentes de variedades tintas, fundamentalmente de la variedad petit verdot y se desaconsejaría la variedad cabernet sauvignon.

- **Ácidos grasos y lípidos.**

Podemos encontrar distinta composición lipídica en los distintos estratos de nuestra piel. Los lípidos del estrato corneo son de gran importancia debido a la función barrera que desempeñan, estando formado fundamentalmente por lípidos como ceramidas, colesterol y ácidos grasos libres.

Los lípidos de nuestra piel pueden verse implicados en procesos de peroxidación lipídica que pueden dar lugar a envejecimiento cutáneo y ciertas patologías. La oxidación de los lípidos del estrato corneo implican una pérdida de la función barrera y un aumento de pérdida de agua transepidérmica. La pérdida de lípidos del estrato corneo puede ser compensada mediante su

³⁷ Dos Santos Freitas, L. et al., *J. Chromatogr. A*, 2008, **1200**, 80-83.

aplicación tópica³⁸. Se ha observado, por ejemplo, como los pacientes con dermatitis tienen bajos niveles tisulares de todos los ácidos grasos poliinsaturados derivados del ácido linoleico y que las aplicaciones tópicas de este ácido calma los efectos de la dermatitis y reduce la pérdida de agua transepidérmica³⁹. Los ácidos grasos y lípidos en cosméticos pueden actuar como vehículos, proporcionando a la vez propiedades viscosantes y emulsificantes. En cuanto a su actividad, actúan reparando la barrera lipídica, como humectantes y como emolientes.

Los aceites analizados, tanto de pepitas como de orujos, poseen una composición lipídica muy rica en ácidos grasos insaturados, siendo de media del 86,8% del total para aceites de pepitas y del 83% para los aceites de orujos. Hemos visto que estos aceites están fundamentalmente formados por ácido linoleico y oleico; acabamos de mencionar la importancia de los derivados del ácido linoleico en relación a algunas alteraciones de la piel. En consecuencia, podemos decir que tanto los aceites de pepitas procedentes de la industria enológica andaluza, como los aceites de orujos que proponemos en este trabajo, pueden ser utilizados por la industria cosmética en relación a su contenido en ácidos grasos. No destacaríamos ninguna variedad en particular en relación a este contenido, a excepción de la variedad tempranillo para los aceites de orujos, aunque todas resultan convenientes.

Según lo anteriormente expuesto, se ha podido comprobar como el uso tópico de todos los analitos determinados en este estudio tiene actividad cosmética. En base a los resultados, podemos decir que los subproductos estudiados poseen en su composición, tanto cualitativa como cuantitativamente, compuestos de gran interés para la industria cosmética y que ambos, uvas de aclaro y orujos, pueden ser utilizados de forma muy ventajosa por dicha industria.

³⁸ Yilmaz, E. and Borchert, H., *Int. J. Pharm.*, 2006, **307**, 232-238.

³⁹ Salvador, A. *et al. Analysis of cosmetic products*, 1ª ed., 2007.

10.4. BIBLIOGRAFÍA.

- Barbul, A. (2008). Proline precursors to sustain mammalian collagen synthesis. *Journal of Nutrition*, 138(10), 2021S-2024S.
- Baumann, L. S. (2007). Less-known botanical cosmeceuticals. *Dermatologic Therapy*, 20(5), 330-342.
- Darr, D., & Fridovich, I. (1994). Free radicals in cutaneous biology. *Journal of Investigative Dermatology*, 102(5), 671-675.
- Delgado Adámez, J., Gamero Samino, E., Valdés Sánchez, E., & González-Gómez, D. (2012). In vitro estimation of the antibacterial activity and antioxidant capacity of aqueous extracts from grape-seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Control*, 24(1-2), 136-141.
- Ditre, C. M., Griffin, T. D., Murphy, G. F., Sueki, H., Telegan, B., Johnson, W. C., Yu, R. J., & Van Scott, E. J. (1996). Effects of α -hydroxy acids on photoaged skin: A pilot clinical, histologic, and ultrastructural study. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 34(2 I), 187-195.
- Dos Santos Freitas, L., Jacques, R. A., Richter, M. F., Silva, A. L. d., & Caramão, E. B. (2008). Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. *Journal of Chromatography A*, 1200(1), 80-83.
- Dutra, E. A., Santoro, M. I. R. M., Micke, G. A., Tavares, M. F. M., & Kedor-Hackmann, E. R. M. (2006). Determination of α -hydroxy acids in cosmetic products by capillary electrophoresis. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 40(2), 242-248.
- España. Real Decreto 1599/1997, de 17 de octubre, sobre productos cosméticos. [Internet] *Boletín Oficial del Estado*, núm. 261, de 31 de octubre de 1997, páginas 31486 a 31513 (28 páginas) Disponible en: http://www.boe.es/diario_boe/txt.php?id=BOE-A-1997-23067 [Consulta: septiembre de 2015].
- Fehér, J., Lengyel, G., & Lugasi, A. (2007). The cultural history of wine - Theoretical background to wine therapy. *Central European Journal of Medicine*, 2(4), 379-391.
- Ferraro, G., Martino, V., Bandoni, A., Nadinic, J. *Fitocosmética: fitoingredientes y otros productos naturales*. 1ª Ed. Buenos Aires: Eudeba, 2012.
- Fiume, M. M., Bergfeld, W. F., Belsito, D. V., Hill, R. A., Klaassen, C. D., Liebler, D. C., Marks, J. G., Shank, R. C., Slaga, T. J., Snyder, P. W., Andersen, F. A., & Gill, L. J. (2014). Safety assessment of vitis vinifera (grape)-derived ingredients as used in cosmetics. *International journal of toxicology*, 33(6), 48S-83S.
- Glampedaki, P., & Dutschk, V. (2014). Stability studies of cosmetic emulsions prepared from natural products such as wine, grape seed oil and mastic resin. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 460, 306-311.

- Goutzourelas, N., Stagos, D., Demertzis, N., Mavridou, P., Karterolioti, H., Georgadakis, S., Kerasioti, E., Aligiannis, N., Skaltsounis, L., Statiri, A., Tsioutsouliti, A., Tsatsakis, A. M., Hayes, A. W., & Kouretas, D. (2014). Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells. *Human and Experimental Toxicology*, 33(11), 1099-1112.
- Hollman, P. C. H., Hertog, M. G. L., & Katan, M. B. (1996). Analysis and health effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 57(1), 43-46.
- Jakobek, L., Šeruga, M., Šeruga, B., Novak, I., & Medvidovic-Kosanovic, M. (2009). Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of Rubus and Prunus species from Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*, 44(4), 860-868.
- Jayaprakasha, G. K., Selvi, T., & Sakariah, K. K. (2003). Antibacterial and antioxidant activities of grape (Vitis vinifera) seed extracts. *Food Research International*, 36(2), 117-122.
- Kitagawa, S., Yoshii, K., Morita, S. -, & Teraoka, R. (2011). Efficient topical delivery of chlorogenic acid by an oil-in-water microemulsion to protect skin against UV-induced damage. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(6), 793-796.
- Lee, K., Cho, J., Park, E., & Choi, J. (2001). Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from Areca catechu as a new anti-ageing agent. *International Journal of Cosmetic Science*, 23(6), 341-346.
- Martín, J. L. and Nogueras, A. El vino: salud y medicina. Recetas de belleza y salud. *Actas del I simposio de la Asociación Internacional de Historia y Civilización de la Vid y el Vino*. Vol. 1. España, 2001.
- Mendoza, L., Yañez, K., Vivanco, M., Melo, R., & Cotoras, M. (2013). Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against Botrytis cinerea. *Industrial Crops and Products*, 43(1), 360-364.
- Okuda, M., Donahue, D. A., Kaufman, L. E., Avalos, J., Simion, F. A., Story, D. C., Sakaguchi, H., Fautz, R., & Fuchs, A. (2011). Negligible penetration of incidental amounts of alpha-hydroxy acid from rinse-off personal care products in human skin using an in vitro static diffusion cell model. *Toxicology in Vitro*, 25(8), 2041-2047.
- Pinnell, S. R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 48(1), 1-19.
- Piowowski, J. P., Kiss, A. K., & Kozłowska-Wojciechowska, M. (2011). Anti-hyaluronidase and anti-elastase activity screening of tannin-rich plant materials used in traditional Polish medicine for external treatment of diseases with inflammatory background. *Journal of ethnopharmacology*, 137(1), 937-941.
- Rawlings, A. V., & Harding, C. R. (2004). Moisturization and skin barrier function. *Dermatologic Therapy*, 17(1), 43-48.

- Sabater, I., and Mourelle, L. *Cosmetología para estética y belleza*. 1ª Ed. España: McGraw-Hill España, 2013.
- Saija, A., Tomaino, A., Trombetta, D., De Pasquale, A., Uccella, N., Barbuzzi, T., Paolino, D., & Bonina, F. (2000). In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. *International journal of pharmaceutics*, 199(1), 39-47.
- Salvador, A. and Chisvert, A. *Analysis of cosmetic products*. 1ª Ed. Elsevier, 2007.
- Sevin, A., Öztas, P., Senen, D., Han, Ü., Karaman, Ç., Tarimci, N., Kartal, M., & Erdogan, B. (2007). Effects of polyphenols on skin damage due to ultraviolet A rays: An experimental study on rats. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*, 21(5), 650-656.
- Smith, W. P. (1996). Epidermal and dermal effects of topical lactic acid. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 35(3 PART I), 388-391.
- Teixeira, A., Baenas, N., Dominguez-Perles, R., Barros, A., Rosa, E., Moreno, D. A., & Garcia-Viguera, C. (2014). Natural bioactive compounds from winery by-products as health promoters: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(9), 15638-15678.
- Thring, T. S. A., Hili, P., & Naughton, D. P. (2009). Anti-collagenase, anti-elastase and anti-oxidant activities of extracts from 21 plants. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 9, 27.
- Unión Europea. Reglamento (CE) nº 1223/2009 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 30 de noviembre de 2009, sobre los productos cosméticos. [Internet] *Diario Oficial de la Unión Europea*, núm. 342, de 22 de diciembre de 2009, páginas 59 a 209 (151 págs.) Disponible en: <https://www.boe.es/buscar/doc.php?id=DOUE-L-2009-82517> [Consulta: septiembre 2015].
- Van Scott, E. J., Ditre, C. M., & Yu, R. J. (1996). Alpha-hydroxyacids in the treatment of signs of photoaging. *Clinics in dermatology*, 14(2), 217-226.
- Wilkinson, J. B., and Moore, R. J. *Cosmetología de Harry*. 6ª Ed. España: Ediciones Díaz de Santos, 2008.
- Yilmaz, E., & Borchert, H. (2006). Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema - An in vivo study. *International journal of pharmaceutics*, 307(2), 232-238.
- Zillich, O. V., Schweiggert-Weisz, U., Eisner, P., & Kerscher, M. (2015). Polyphenols as active ingredients for cosmetic products. *International Journal of Cosmetic Science*, 37(5), 455-464.

CONCLUSIONES.

- 1.- Se han caracterizado dos subproductos de especial potencial de la industria vitivinícola andaluza: uvas de aclareo y orujos. La finalidad ha sido conocer su composición en determinados compuestos que destacan por su actividad biológica y su interés industrial. Para lograr dicho objetivo se han analizado muestras de distintas variedades y en distintas vendimias.
- 2.- De manera preliminar a la caracterización, se realizó un estudio y selección de la metodología necesaria para la determinación de los analitos objeto de este estudio. Se consideró relevante modificar el método DPPH para la medida de la actividad antioxidante. A partir de aquí, se desarrolló un procedimiento simplificado para el análisis de muestras vínicas y derivados, que permite solventar los problemas asociados a esta metodología. Se ha conseguido desarrollar un método más sencillo desde un punto de vista operacional, con una buena repetibilidad y sin producir errores significativos con respecto a la metodología original. Esta simplificación permite utilizar el método para la realización de análisis de rutina.
- 3.- La caracterización de los subproductos ha conllevado el estudio de 5 parámetros generales y la determinación de 49 compuestos individuales entre polifenoles, ácidos orgánicos de cadena corta, aminoácidos, ácidos grasos y tocoferoles.
- 4.- El estudio de los orujos se realizó a partir del análisis de cinco variedades de orujo durante tres vendimias consecutivas. Los resultados han revelado importantes cantidades en polifenoles, principalmente flavonoles y antocianinas, ácidos orgánicos, una cantidad a considerar de aminoácido y un importante contenido en ácidos grasos insaturados y vitamina E. Así mismo, se ha podido constatar actividad antioxidante en

dichas muestras. Se ha concluido que los resultados obtenidos no dependen en gran medida de la vendimia analizada, influyendo de forma significativa sólo en el contenido de flavanoles y ácidos orgánicos. Son, de manera general, los compuestos polifenólicos los que se ven más influidos por la variedad de orujo. Las variedades petit verdot y tintilla de Rota se han mostrado como las más apropiadas para utilizar en cuanto a su contenido polifenólico se refiere. La variedad cabernet sauvignon, si bien destaca por su contenido en aminoácidos, se podría considerar la menos conveniente de utilizar por su valores, significativamente bajos, en algunas familias de polifenoles.

- 5.- La uva de aclareo analizada correspondió a cinco variedades recogidas en una vendimia y algunas repetidas en la vendimia siguiente. Igualmente, se han obtenido resultados a destacar en todos los parámetros analizadados. En el caso de la uva de aclareo destaca su contenido en ácidos fenólicos, falvanos y ácidos orgánicos, si bien para el resto de parámetros se obtienen cantidades a considerar. Se ha podido deducir que la variedad de uva no es un factor tan determinante en los resultados como el punto de maduración exacto de la recogida. En cuanto a variedades podríamos destacar la petit verdot y tintilla de Rota en función de los datos obtenidos para la actividad antioxidante, resaltando la variedad petit verdot por su contenido en taninos y la tintilla de Rota por su contenido en flavonoles. En relación a la maduración de la uva de aclareo, se ha obtenido que pequeñas variaciones en la maduración, durante el periodo de envero, da lugar a cambios a tener en cuenta en su composición. Para conseguir una composición equilibrada en todas las familias de compuestos, se ha estimado como óptima una maduración tecnológica próxima a 0,5.

- 6.- Se propuso la posibilidad de realizar extracciones del orujo completo para obtener aceites en lugar de a la pepita. Los resultados mostraron importantes cantidades de ácidos grasos insaturados y tocoferoles para ambos tipos de aceites, si bien las muestras de aceites de orujos demostraron tener contenidos en tocoferoles muy superiores a los de pepitas. Se ha deducido un posible efecto protector de los polifenoles presentes en los orujos frente a la posible oxidación de los tocoferoles durante el proceso de extracción de los aceites. En base a los resultados se concluyó que la extracción del aceite del orujo completo puede resultar un procedimiento favorable frente al de pepitas, en cuanto a que no es necesario realizar la separación de las pepitas y puede obtenerse un aceite de características diferenciadas.
- 7.- Se estudió la influencia y posible utilización de una cámara climática para la deshidratación de los orujos como método de conservación. Los resultados obtenidos mostraron que este método resulta no sólo viable sino ventajoso ya que se consigue deshidratar la muestra, mejorando su estado de conservación, a la vez que se obtiene una mayor extractabilidad de compuestos antioxidantes. Se ha podido constatar bibliográficamente que este hecho puede ser debido a la activación de determinadas enzimas que modifican el tejido celular del hollejo aumentando su permeabilidad.
- 8.- Se ha considerado la posible aplicabilidad cosmética de los subproductos estudiados. A partir de una investigación bibliográfica sobre las posibles propiedades cosméticas de los analitos determinados y en base a los resultados obtenidos se ha valorado su posible utilidad concluyéndose que todos los subproductos estudiados poseen una composición en compuestos de gran interés para la industria cosmética pudiendo ser utilizados de manera muy ventajosa con este fin.

ANEXOS.